

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-505231

(43)公表日 平成10年(1998)5月26日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 N 15/09

A 61 K 39/395

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00

A 61 K 39/395

ZNAA

C

N

L

ADV

ADVG

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-507371
(86) (22)出願日	平成7年(1995)8月11日
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997)2月12日
(86)国際出願番号	PCT/US95/09641
(87)国際公開番号	WO96/04925
(87)国際公開日	平成8年(1996)2月22日
(31)優先権主張番号	08/289,576
(32)優先日	1994年8月12日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	イムノメディクス、インコーポレイテッド アメリカ合衆国、07950 ニュー・ジャー ジー、モリス・プレインズ、アメリカン・ ロード 300
(72)発明者	リュン、シュイーオン アメリカ合衆国、07940 ニュー・ジャー ジー、マディソン、キングズ・ロード 254
(72)発明者	ハンセン、ハンス アメリカ合衆国、08087 ニュー・ジャー ジー、ミスティック・アイランド、ノー ス・バージー・ドライブ 2617
(74)代理人	弁理士 奥山 尚男 (外3名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B細胞リンパ腫細胞および白血病細胞に特異的な免疫結合体およびヒト化抗体

(57)【要約】

キメラLIL2モノクローナル抗体、ヒト化LIL2モノク
ローナル抗体、これらの抗体をコードする分離DNA、
DNAを含むベクター、およびキメラLIL2抗体および
ヒト化キメラLIL2抗体と細胞障害剤またはB細胞リン
パ腫および白血病の治療および診断に使用する標識との
結合体。

【特許請求の範囲】

1. LL 2 モノクローナル抗体 (mAb) の軽鎖可変 (VK) 領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む、第4図A (配列識別番号1) の分離されたポリヌクレオチド。
2. LL 2 mAbの重鎖可変 (VH) 領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む、第4図B (配列識別番号3) の分離されたポリヌクレオチド。
3. hLL 2 VKドメインのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む、第5図A (配列識別番号5) の分離されたポリヌクレオチド。
4. hLL 2 VHドメインのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む、第5図B (配列識別番号7) の分離されたポリヌクレオチド。
5. 請求項1乃至4のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質。
6. アミノ酸配列 (配列識別番号2の残基24~40)
KSSQSVLYSANHKNYLA

を含む、LL 2 mAbのVK領域の相補性決定領域1 (CDR1) 分離ポリペプチド。

7. アミノ酸配列 (配列識別番号2の残基56~62)
WASTRES

を含む、LL 2 mAbのVK領域の分離CDR2ポリペプチド。

8. アミノ酸配列 (配列識別番号2の残基95~103)
HQYLSSWTF

を含む、LL 2 mAbのVK領域の分離CDR3ポリペプチド。

9. アミノ酸配列 (配列識別番号4の残基31~35)
SYWLH

を含む、LL 2 mAbのVH領域の分離CDR2ポリペプチド。

10. アミノ酸配列 (配列識別番号4の残基50~66)
YINPRNDYTEYNQNFKD

を含む、LL 2 mAbのVH領域の分離CDR2ポリペプチド。

11. アミノ酸配列（配列識別番号4の残基99～105）

RDITTFY

を含む、LL2-mAbのVH領域の分離CDR3ポリペプチド。

12. VKpBRプラスミドに挿入された請求項1に記載のポリヌクレオチド。

13. VHpBSプラスミドに挿入された請求項2に記載のポリヌクレオチド。

14. さらにIgプロモーターおよびシグナルペプチド配列を含む、請求項1
2または13に記載のプラスミド。

15. LL2pKhと呼ばれる哺乳類発現ベクターに組み込まれ、前記ベクターがさ
らにIgプロモーター、シグナルペプチドDNA配列、ヒトκ定常領域のゲノム
配列、Igエンハンサー、κエンハンサー、およびマーカー遺伝子を含む、請求
項1または3に記載のポリヌクレオチド。

16. LL2pK1gと呼ばれる哺乳類発現ベクターに組み込まれ、前記ベクターが
さらにIgプロモーター、シグナルペプチドDNA配列、ヒトIgG1定常領域
のゲノム配列、Igエンハンサーおよびマーカー遺伝子を含む、請求項2または
4に記載のポリヌクレオチド。

17. ヒトκ定常領域およびヒトIgG1定常領域に連結された請求項1または
2のmLL2-mAbの軽鎖および重鎖を含む、請求項3または4のcLL2
mAb。

18. hLL2-mAbが親mLL2抗体のB細胞腫細胞および白血球細胞タ
ゲッティング特性および細胞インターナリゼーション特性を実質的に保持してい
るような、ヒトκ定常領域ドメインおよびヒトIgG1定常領域ドメインにそれ
ぞれ連結された第1A図および第1B図のヒトVK領域およびヒトVH領域のフ

レームワーク配列にそれぞれ連結された請求項6乃至10のいずれかのmLL2
mAbの軽鎖相補性決定領域および重鎖相補性決定領域を含む、hLL2-m
Ab。

19. 診断用試薬または治療用試薬に共有結合したcLL2抗体またはhLL
2抗体またはそれらのフラグメントを含む結合体。

20. 前記診断用試薬が標識を含むことを特徴とする、請求項19に記載の結

合体。

21. 前記治療用試薬が細胞障害剤を含むことを特徴とする、請求項19に記載の結合体。

22. 前記抗体またはそのフラグメントの炭水化物部分によって前記試薬が前記抗体またはそのフラグメントに結合していることを特徴とする、請求項19に記載の結合体。

23. 被験者のB細胞リンパ腫または白血病を治療する方法において、製薬上許容できる媒体で調合された請求項21に記載の結合体の治療上有効な量を前記被験者に投与するステップを含む方法。

24. 被験者のB細胞リンパ腫細胞または白血病細胞を診断する方法において、製薬上許容できる媒体で調合された請求項20に記載の結合体の診断上有効な量を前記被験者に投与するステップと、前記標識を検出するステップとを含む方法。

25. アミノ酸配列（配列識別番号の残基24～40）

KSSQSVLYSANHKNYLA

を含む、分離された、LL2mAbのVK領域の相補性決定領域1（CDR1）ポリペプチドと、

アミノ酸配列（配列識別番号2の残基56～62）

WASTRES

を含む、LL2mAbのVK領域の分離CDR2ポリペプチドと、

アミノ酸配列（配列識別番号2の残基95～103）

HQYLSSWTF

を含む、LL2mAbのVK領域の分離CDR3ポリペプチドと、

アミノ酸配列（配列識別番号4の残基31～35）

SYWLH

を含む、LL2mAbのVH領域の分離CDR1ポリペプチドと、

アミノ酸配列（配列識別番号4の残基50～66）

YINPRNDYTEYNQNFKD

を含む、L L 2 mA b のV H領域の分離C D R 2 ポリペプチドと、
アミノ酸配列（配列識別番号4の残基99～105）

R D I T T F Y

を含む、L L 2 mA b のV H領域の分離C D R 3 ポリペプチドと
を含む、請求項18に記載のh L L 2 mA b。

【発明の詳細な説明】

B細胞リンパ腫細胞および白血病細胞に特異的な 免疫結合体およびヒト化抗体

発明の背景

本発明は一般に癌の診断用および治療用に使用する免疫結合体に関する。詳細には、本発明は、B細胞リンパ腫細胞および白血病細胞に対して向けられ、組換えにより生産されたキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体(humanized mAb)に関し、その抗体は診断用試薬または治療用試薬に共有結合することができ、その際に、抗体結合機能およびインターナリゼーション機能を喪失せず、しかもヒト抗マウス抗体の產生が少ない。

非ホジキン型悪性リンパ腫(NHL)および慢性リンパ性白血病は、依然として癌死亡率の重要な一因であるB細胞悪性腫瘍である。このような悪性腫瘍は、種々の治療に対して様々に応答する。化学療法に対する応答はかなり良好であり、NHLの臨床的病期を適切に分類できる場合、限局性疾患患者に関しては、部分放射線治療を使用して満足な治療を提供することが可能である(Hall et al., Radiology for the Radiologist(放射線医師のための放射線医学)、Lippincott, Philadelphia, 1989, pp 365-376)。しかし、化学療法に付随する中毒性の副作用や、全身放射線療法はもとより、局所放射線療法による造血系に対する毒性のため、このような治療方法の使用は制限を受ける。患者の約半数が病気で死亡する(Posner et al., Blood, 61: 705(1983))。

放射性核種や他の細胞毒性試薬に結合したターゲッティング・モノクローナル抗体を使用すると、このような試薬を腫瘍部位に直接送達することが可能になり、その結果、正常組織の有毒試薬被曝が制限される(Goldenberg, Semin, Nucl. Med.

ed., 19:332(1989))。近年、抗体を基礎とする療法の可能性および、腫瘍関連抗原を正確に定位できる可能性が実験的試験と臨床試験の両者で証明された(例えば、Thorpe, TIBTECH, 11: 42(1993); Goldenberg, Scientific American, Science & Medicine, 1: 64(1994); Baldwinら、米国特許第4,925,922号および第4,9

16, 213号; Young、米国特許第4918163号; 米国特許第5, 204, 095号; Irieら、米国特許第5, 196, 337号; Hellstromら、米国特許第5, 134, 075号および第5, 171, 665号を参照されたい)。腫瘍による抗体取り込みは一般に低く、総注入量の0.01%から0.001%にすぎないということもあって、腫瘍関連マーカーに対する放射標識抗体または放射標識抗体フラグメントの使用は、一般に治療より腫瘍の定位の目的で成功をおさめてきた(Vaughan et al., Brit. J. Radiol., 60: 567(1987))。腫瘍への投与量を増加させるために放射標識濃度を上昇させると、健常な組織への放射能被曝も増加することになるため、一般に逆効果である。

LL-2 (EPB2) は、B細胞リンパ腫細胞およびリンパ性白血病細胞により速やかにインターナライズ（内在化）され、前述の困難の一部を克服することができる極めて特異的な抗B細胞リンパ腫細胞および抗リンパ性白血病細胞ネズミ・モノクローナル抗体 (mAb) である(Shih et al., Int. J. Cancer, 56: 538(1994))。LL-2は、IgG2a抗体型であり、Raji Bリンパ腫細胞株を抗原の起源として使用して開発された(Pawlak-Byczkowska et al., Cancer Res., 49: 4568(1989))。ネズミ LL-2 (mLL-2) はCD22のエピトープと反応することが判明している(Belisle et al., Proc Amer. Assn. Clin. Res., 34: A2873(1993))。CD22分子は前駆細胞および初期前B細胞の細胞質に発現され、成熟B細胞の細胞表面に出現する。

mLL-2は、組織切片の免疫染色により、試験したB細胞リンパ腫51中50と反応することが証明された。mLL-2は、放射免疫検出法で決定されるため、*in vivo*でB細胞リンパ腫細胞を検出する極めて高感度の手段である(Murthy et

al., Eur. J. Nucl. Med., 19: 394(1992))。^{99m}Tcで標識mLL-2のFabフラグメントは、B細胞リンパ腫に罹患しているフェーズII治験患者の既知病変65中63を定位した(Mills et al., Proc. Amer. Assn. Cancer Res., 34: A2857(1993))。さらに、¹³¹I標識されたmLL-2は、B細胞リンパ腫患者で治療上有効であった(Goldenberg et al., J. Clin. Oncol., 9: 548(1991))。外毒素PE38KDELに結合したmLL-2 Fabは、ヌードマウスで成長している測定可能なヒト・リンパ腫異種移植片 (CA-46) を完全緩解させた(Kreitman et al., Canc

er Res., 53: 819(1993)。

mLL2の臨床使用は、他のほとんどの有望なネズミ抗体の場合とちょうど同じ様に、ヒトでHAMA応答が発生することによって制限されてきた。HAMA応答はmLL2の注射後に必ず見られるわけではないが、かなりの数の例で、mLL2の単回投与後に患者にHAMAが発生した。HAMA応答は、アナフィラキシの問題があるばかりではなく、循環結合体の大部分が循環抗マウス抗体と複合体を形成し、循環抗マウス抗体によって封鎖されるため、このような抗体結合体の診断上および治療上の有用性が制限される可能性がある。このことは、約6mgのmLL2-¹³¹I-IgGを単回注射後に、患者の約30%に低レベルのHAMA応答が発生し、追加の注射によってほぼ全例に強いHAMA応答が発生した1つの試験によって例証される。一方、^{99m}Tcで標識したmLL2-Fabでは、HAMA応答は認められなかった。一般に、このようなHAMA応答によって、mLL2抗体の診断能力および治療能力の完全実現の障害になる可能性がある。

上記の通り、F(ab)₂やFabのようなmLL2のフラグメントを使用すると、特にこれらの免疫原性の問題が緩和または回避されるが、治療に向けて細胞免疫性を誘導するときや、生存期間を増大した抗体が必要な場合など、IgG全体の方が望ましい情況もある。

本発明の目的は、治療モダリティまたは診断モダリティとしてのmLL2-I-

gG抗体の価値を最大限に高めるために、また多回投与モダリティまたは持続投与モダリティでの有用性を高めるために、mLL2の抗原結合特性を保持するか、同じ物を受けた被験でのHAMA誘発がより少ないmLL2関連のマウス/ヒト・キメラmAb(cLL2)およびヒト化mAb(hLL2)を生産することにある。

本発明のまたの目的は、相補性決定領域(CDR)を含め、cLL2-mAbおよびhLL2-mAbの軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を提供することにある。

本発明の目的は、治療モダリティまたは診断モダリティを含むhLL2-mA

b および c L L 2 mA b の結合体を提供することもある。

さらに、本発明の目的は、本発明のヒト化キメラmA b を使用する治療方法および診断方法を提供することにある。

以上の目的は、明細書および付属の特許請求の範囲に後述する発明によって達成されている。

発明の概要

本発明の1つの態様で、ネズミ軽鎖可変領域（V K）および重鎖可変領域（V H）がヒト定常軽鎖（κ）および重鎖（I g G₁）に連結されるm L L 2 mA b 関連のc L L 2 mA b が得られる。このキメラmA b は、親m L L 2 のBリンパ腫細胞および白血病細胞のターゲッティング特性およびインターナリゼーション（内在化）特性を保持する。

本発明のまたの態様で、m L L 2 mA b の軽鎖および重鎖の相補性決定領域（C D R）が、それぞれヒトV K領域およびV H領域のフレームワーク（F R）配列に連結され、その後で、それぞれヒトκ定常部ドメインおよびI g G₁定常部ドメインに連結されるm L L 2 mA b 関連のh L L 2 mA b が得られる。このヒト化抗体は、親m m L L 2 mA b のリンパ腫細胞および白血病細胞のタ

ーゲッティング特性およびインターナリゼーション特性を保持し、より低いH A MA反応を示すと考えられる。

また別の態様では、それぞれh L L 2 mA b およびc L L 2 mA b の、可変軽鎖および可変重鎖のアミノ酸配列をコードするDNAを含む分離されたポリヌクレオチドが得られる。

それ以外の態様で、V K鎖およびV H鎖のC D Rのアミノ酸配列が得られる。

さらに別の態様で、h L L 2 mA b またはc L L 2 mA b が診断用試薬または治療用試薬に共有結合している諸結合体が得られる。

さらに別の態様で、前述のmA b 結合体を使用してB細胞リンパ腫およびリンパ性白血病を診断することができる方法が得られる。

本発明の以上その他の態様および実施例は、以下の明細書および添付の特許請求の範囲を検討することによって明確になるであろう。

図面の説明

第1図は、ネズミLL2 VKドメインと、ヒト化LL2 VKドメイン（第1図A配列識別番号2および6）およびVHドメイン（第1図B配列識別番号4、9および8）とを比較する図である。mFR配列（ネズミと呼ばれる）と異なるhFR配列（REIhuVKおよびEUHuVHと呼ばれる）のみを示し、星印で明示してある。これらの位置でより多くの残基がヒト化構造に保持されていた。CDRを枠で囲ってある。コンピュータモデルリングによるCDR接触を示すFR残基を下線で示す。

第2図は、LL2 CDRとそのフレームワーク領域（FR）の隣接関係を示す図である。mLL2のVLドメインおよびVHドメインのエネルギー最小化モデルを別個に構築し、半径4.5 Å以内のすべてのFR残基またはあらゆるCDR原子を潜在的CDR-FR接触と認定した。軽鎖のCDR（第2図A、L1、L2、およびL3）および重鎖（第2図B、H1、H2およびH3）を、それぞ

れ空間充填フレームワーク上に重なった「ボールと棒」として表現されている。

第3図は、軽鎖ステージングベクター（VKpBR）および哺乳類発現ベクター（pKH）（第3図A）、ならびに重鎖ステージングベクター（VHpBS）および哺乳類発現ベクター（pG1g）（第3図B）を示す図である。

第4図は、LL2 VKドメインの二本鎖DNAおよびアミノ酸配列（第4図A配列識別番号1および2）ならびにLL2 VHドメイン二本鎖DNAおよびアミノ酸配列（第4図B配列識別番号3および4）を示す図である。対応するDNA配列にコードされているアミノ酸配列を1文字コードとして示す。CDRアミノ酸配列を枠で囲ってある。LL2 VKのFR1に位置するAsn-グリコシル化部位（第4図A配列識別番号2）を、下線付きNVT配列として示す。

第5図Aは、hLL2 VKドメインの二本鎖DNAおよび対応するアミノ酸残基（配列識別番号5および6）を示す図である。CDRアミノ酸配列を枠で囲ってある。対応するVHドメインのデータを第5図Bに示す（配列識別番号7および8）。

第6図は、ヒト化VH領域のPCR／遺伝子合成およびステージングベクター

V H p B Sへのサブクローニングを表す略線図である。

第7図は、非還元条件（レーン6～8）および還元条件（レーン3～5、軽鎖および重鎖）でのm LL 2抗体およびc LL 2抗体のSDS-PAGE分析を示す図である。レーン3およびレーン6はコントロール抗体を含む。

第8図は、還元条件（レーン3～5）および非還元条件（レーン6～8）でのc LL 2抗体およびh LL 2抗体の異なるバージョンのSDS-PAGE分析を示す図である。

第9図は、還元条件（レーン3～6）および非還元条件（レーン7～10）での混合適合化(mix-and-match)c LL 2抗体およびh LL 2抗体のSDS-PAGE分析を示す図である。c LL 2はコントロールの役割をする。

第10図は、トレーサー放射標識m LL 2と細胞への結合を競うm LL 2抗体およびc LL 2抗体を含む比較Raji細胞競合抗体結合分析の結果を示す図である。

第11図は、ヒト化LL 2/キメラLL 2混合物をc LL 2と比較した比較Raji細胞競合抗体結合分析の結果（第11図A）、および2つのバージョンのh LL 2をc LL 2と比較した比較Raji細胞競合抗体結合分析の結果（第11図B）を示す図である。

第12図は、抗体インターナリゼーション：表面結合の比率を、c LL 2抗体、c LL 2抗体（QからVへの突然変異誘発）、h LL 2抗体およびm LL 2抗体の時間の関数として比較した図である。

第13図は、エンドグリコシダーゼFによる脱グリコシル化後のm LL 2およびc LL 2のSDS-PAGE分析を示す図である。

第14図は、m LL 2の脱グリコシル化がRaji細胞への結合アフィニティに及ぼす影響を示す図である。

発明の詳細な説明

m LL 2 mAbのVL領域およびVH領域をコードするc DNAを分離して、それぞれヒト抗体のκ定常領域およびIg G₁定常領域をコードする遺伝子を含む哺乳類発現ベクターに、組換えにより別々にサブクローニングした。この2

つのリコンビナントDNAを哺乳類細胞に共トランسفェクトすると、親mLL2 mAbと同様、Bリンパ腫細胞に食欲に結合し、Bリンパ腫細胞により速やかにインターナライズされるcLL2 mAbを発現した。

同様に組換えによって、VK DNAおよびVH DNAのCDRを、それぞれヒトVK領域およびVH領域のフレームワーク(FR)配列に連結させ、その後で、上記hLL2と同様、哺乳類細胞に発現するために、それぞれヒトκ定常領域およびIgG₁定常領域に連結させた。

本明細書では、“cLL2”または“cLL2 mAb”という表現は、ネズ

ミVK領域およびVH領域を、それぞれヒト定常軽鎖および定常重鎖に連結するかサブクローニングすることにより構築されたキメラ・モノクローナル抗体を指すつもりである。“hLL2”または“hLL2 mAb”という表現は、cLL2のネズミFR配列をヒト・フレームワーク領域の配列と置き換えることによる、キメラ・モノクローナル抗体のヒト化を指す。

先行技術の抗体結合体と比較して、B細胞リンパ腫特異的ターゲッティングおよび白血病細胞特異的ターゲッティング、標的細胞内への迅速なインターナリゼーション、診断用試薬または化学療法試薬の迅速な細胞内放出（それによって試薬の有効性が上昇する）、および患者でのHAMA応答のが低減する可能性という利点を備えた、cLL2 mAbおよびcLL2 mAbと、製薬上許容できる媒体（例えば、Remington's Pharmaceutical Science (Remingtonの薬科学)、第18版、Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990を参照）で調合された診断用試薬または化学療法試薬との間で共有結合体を調製することができる。

cLL2 mAbのVK付加炭水化物部分はBリンパ腫細胞への結合に関与しないことが本明細書で明らかにされているため、例えば酸化炭水化物誘導体を介するなど、このような炭水化物部分を介して試薬が抗体に結合している結合体を使用する方が好ましい。例えば、引用することによりその内容が本明細書に組み込まれる、Shihらの米国特許第5,057,313号、Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832(1988)、および同時係属で同一所有者にかかるHansenらの米国出願第08/162,912号で、このような結合体を生産する方法および診断用および治療用に使用す

る方法が得られる。重合キャリヤを使用せずに試薬を酸化炭水化物に直接結合する方法が、やはり引用することにより本明細書に組み込まれるMcKearnらの米国特許第5,156,840号に記述されている。

広く様々な診断用試薬および治療用試薬を本発明の抗体に都合よく結合させることができる。この例としては、ドキソルビシン、メトトレキサート、タキソ

ルなどの諸化学療法剤、蛍光分子などの検出可能標識または重金属や放射核種などの細胞障害剤が錯体を形成することができるD T P Aなどの諸キレート化剤、*Pseudomonas*外毒素などのトキシン類などがある。この結合体のうち幾つかの実施態様を以下の実施例に記述する。

本発明で使用する細胞株および培地は、L L 2 (E P B - 2) ハイブリドーマ細胞 (上記Pawlak-Byczkowskaら、1989) 、Sp2/0-Ag14骨髄腫細胞 (ATCC, Rockville, MD) およびRaji細胞などである。この細胞は、10%のウシ胎仔血清 (F C S) (Gibco/BRL, Gaithersburg, MA) 、2 mMのL-グルタミンおよび75 μg/mlのゲンタマイシンを加えたDulbeccoの改良Eagle培地 (DMEM) (完全D E M E) で培養することが望ましい。トランスフェクトーマは、10%のF C Sおよび75 μg/mlのゲンタマイシンを加えたハイブリドーマ無血清培地であるH S F M (Gibco/BRL, Gaithersburg, MA) (完全H S F M) で成長させるか、指示がある場合には、抗生物質のみを含有するH S F Mで成長させる。トランスフェクトーマの選択は、500 μg/mlのハイグロマイシン (Calbiochem, San Diego, CA) を含有する完全H S F Mで実行することが可能である。すべての細胞株を5%のCO₂中、37°Cで維持することが望ましい。

本発明の重要な態様は、抗体の可変ドメインをコンピュータモデリングでモデル化できることである。(例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Goldenbergら編、Cancer Therapy with Radiological Antibodies (放射標識抗体による癌治療)、CRC Press, Boca Raton, FL, 1994の中のDionを参照されたい)。一般に、m L L 2 2抗体とh L L 2抗体の両者の三次元構造は、相同関係によってモデル化するのが最善の方法である。推測されるm L L 2軽鎖F R領域の一次配列とヒトR E I (V K) の一次配列との間で高頻度の残基一致 (75

. 0 ~ 92.3%) がみられたため、引用することにより本明細書に組み込まれるProtein Data Bank(タンパク質データバンク) (PDR Code IREI, Bernsteinら、J. Mol.

Biol. 112: 535 (1977)) の結晶学データを利用できるので、この研究が促進された。同様に、抗体EU (VH) 配列は、mLL2重鎖のFR1～FR3コンピュータ相対物として選択することができ、FR4はNEWMを基礎とした。EU配列のX線座標データは現在不足しているため、FR1～FR4のNEWM構造データ (PDR Code 3FAB) を使用することが可能で、必要に応じてmLL2またはEU (hLL2) に対応するようにアミノ酸側基を置き換えることができる。軽鎖のCDRは、IMCP (L1およびL2) およびIREI (L3) の対応する配列からモデル化することができる。重鎖CDRの場合、H1およびH2はそれぞれ2HFLおよび1MCPを基礎とすることができるが、H3は新たにモデル化することができる。C α とC β との間の捻り角を維持するように、可能な場合はいつも、側基置換を実施する。エネルギー最小化は、AMBER分子力場 (Weiner et al, J Amer. Chem. Soc. 106: 765 (1984)) により、収束法を使用して遂行した。潜在的に重要なFR-CDR相互作用は、mLL2の可変軽鎖および可変重鎖を最初にモデリングすることにより決定した。各CDR内のあらゆる原子の半径4.5 Å以内のあらゆるFR残基を同定し、それによってhLL2の最終デザインモデルに保持することができる。

hLL2のVKドメインおよびVHドメインの配列をデザインすると、その後は、PCR反応で長い合成DNAオリゴヌクレオチドを鋳型として使用し、短いオリゴヌクレオチドをプライマとして使用して、CDR合体を遂行することができる。ほとんどの場合、VKドメインまたはVHドメインをコードするDNAは、約350 bpとなる。コドン同義性（縮重）を利用して、コードされるアミノ酸を変化させずに、独特な制限部位を、V遺伝子DNA配列の中央に近い領域に容易に導入することができる。例えば、最初にデザインされたアミノ酸配列を維持しながら、hLL2 VHドメインのDNAヌクレオチド157～162位（アミノ酸53位および54位）に、独特なAvrII部位を導入することができ

る

(第4図B)。自動DNAオリゴヌクレオチド・シンセサイザ (Cyclone Plus DNA Syntesizer, Milligen-Bioscience) で、AvrII部位の2本の長い非重複1本鎖DNAオリゴヌクレオチド (~150 bp) 上流および下流を作ることができる(例えば、以下の実施例3、オリゴAおよびオリゴBを参照されたい)。オリゴAやオリゴBなどの全長DNAオリゴヌクレオチドの収率は低いと予測されるため、PCR反応で2組の横側オリゴヌクレオチド(実施例3、オリゴAはオリゴ配列識別番号10および11、オリゴBはオリゴ配列識別番号12および13)により増幅することができる。必要な制限部位を含むプライマをデザインして、後続のサブクローニングを容易にすることができます。オリゴAおよびオリゴBの各プライマは、それぞれ結果として得られるオリゴAおよびオリゴBのPCR産物がAvrII部位でフレーム内連結してhLL2-VHドメインをコードしている全長DNA配列(約350 bp)を形成することができるよう、AvrII部位に重複配列を含まなければならない。(PstIおよびAvrIIで制限消化した)オリゴAのPCR産物と(AvrIIおよびBstEIIで制限消化した)オリゴBのPCR産物をAvrII部位で連結させて、それらをステージングベクターVHPBSのPstII/BstE II部位へサブクローニングすることは、1つの3フラグメント連結ステップで完成することができる(例えば、実施例3を参照されたい)。正しい配列がVHPBSにサブクローニングされたことは、最初に制限消化分析で分析し、その後で、Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 (1977)による逐次反応で確認することができる。

Igプロモーター、リーダー配列およびhLL2-VH配列を含むHindIII/BamHIフラグメントをステージングベクターから切除して、pSVgptベースのベクター-pG1gの対応する部位にサブクローニングすることが可能で、このpG1gはヒトIgG定常領域のゲノム配列、Igエンハンサーおよびgpt選択マーカーを含み、最終発現ベクターhLL2pG1gを形成する。同様な戦術を使用してhLL

2 VL配列を構築することができる。長いオリゴヌクレオチド(以下の実施例

オリゴCおよびDを参照されたい) のためのP C R産物の連結用に選択された制限部位は、この場合NruIでよい。

I gプロモーター、リーダー配列およびh L L 2 VK配列を含むDNA配列をBamH1/HindIII処理によってステージングベクターVKpBRから切除して、p SVhygベースのベクターpKhの対応する部位にサブクローニングすることが可能で、このpKhは、ヒトκ鎖定常領域、ハイグロマイシン選択マーカー、I gおよびκエンハンサーを含み、最終発現ベクターhLL2pKhを形成する。

ヒト化すると、アフィニティが低下したり喪失する場合もあるため、もとのアフィニティを回復させるためには、さらに修飾することが必要であることがある(例えば、引用することにより組み込まれる、Tempest et al., Bio/Technology 9: 266(1991); Verhoeven et al., Science 239: 1534(1988)を参照されたい)。c L L 2はネズミの相対物に匹敵する結合アフィニティを示すことが判明しているため(以下の実施例5を参照)、原型のh L L 2に欠陥デザインがあればその欠陥デザインは、c L L 2の軽鎖と重鎖を混合して、ヒト化バージョンと適合させることによって同定することができる。非還元条件(ジスルフィドL-H鎖連結が無傷のままである)および還元条件(鎖が切れる)での異なる混合により適合化した(mix-and-match)ヒト化キメラLL2のSDS-PAGE分析で、分子の特性に関する異なる種類の軽鎖と重鎖の関係を分析することができる。例えば、多重バンドとしての移動、あるいはより大きいみかけの分子サイズとしての移動は、LL2のネズミVKドメインのFR1領域でみられるN結合グリコシル化部位にグリカン基が存在することに起因する可能性がある。別の実施例では、約25kDaで移動する不連続バンドは、予期された非グリコシル化軽鎖の分子サイズである。

一般に、c L L 2 mA bを調製するために、DNA産物およびプライマを使

用してP C Rクローニングで、m L L 2のVH鎖およびVK鎖を得ることができる。(下記のOrlandiらの論文および下記のLeungらの論文)。上記と同様、VK P C Rプライマをp BR 3 2 7ベースのステージングベクター(VKpBR)にサブクローニングすることも可能である。上記と同様、類似したpBluescriptベ

スのステージングベクター (VH_pBS) にVH PCR産物をサブクローニングすることも可能である。HindIII制限エンドヌクレアーゼおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼを使用して、VK配列およびVH配列を含むフラグメントを、プロモーター配列およびシグナルペプチド配列と共に、ステージングベクターから切除することができる。通常通り、VKフラグメント（約600 bp）を哺乳類発現ベクター（例えば、pKh）にサブクローニングすることができる。pKhは、ヒトκ定常領域のゲノム配列、Igエンハンサー、κエンハンサーおよびハイグロマイシン耐性遺伝子を含むpSVh_ygベースの発現ベクターである。同様に、ヒトIgG1定常領域のゲノム配列、Igエンハンサーおよびキサンチンーグアニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ (gpt) 遺伝子を担持しているpSVg_ptベースの発現ベクターpG1gに、約800 bpのVHフラグメントをサブクローニングすることができる。2つのプラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/0-Ag14細胞などの哺乳類発現細胞にトランスフェクトして、ハイグロマイシン耐性を選択する。選択で生き残ったコロニーを拡大し、上清液のcLL2抗体産生をELISA法でモニタリングする。約1～10⁶細胞のトランسفエクション効率が望ましい。この系で、0.1～2.5 μg/mlの抗体発現レベルが期待できる。

RNA分離、cDNA合成および増幅を次のように実施することができる。引用することにより本明細書に組み込まれる、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子クローニング: 実験マニュアル)・第2版・Cold Spring Harbor Press, 1989) の方法に従って、合計約10⁷細胞を使用して、LL

2ハイブリドーマ細胞株から全細胞RNAを調製することができる。SuperScript前増幅システム(Gibco/BRL., Gaithersburg, MD)を使用するなどして、通常通り、全RNAから第1鎖cDNAを逆転写することができる。簡単に記述すると、2 μlの10×合成緩衝液 [200 mM Tris-HCl(pH 8.4)、500 mM KCl、25 mM MgCl₂、1 mg/ml BSA]、1 μlの10 mM dNTP mix、2 μlの0.1 M DTT、および200単位のSuperScript逆転写酵素の存在下、反応体積20 μlで、50 ngのランダムプライマを5 μgのRNAにアニーリングすることができる。延長ステップは、最

初は室温で10分間進行させ、続いて42℃で50分間インキュベートする。反応混合物を90℃で5分間加熱することにより反応を停止することができる。

引用することにより本明細書に組み込まれるOrlandiら(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 3833 (1989))の記述通りに、cLL2またはhLL2のVK配列およびVH配列を増幅することができる。プライマCK3BHおよびプライマVK5-3を使用して、VK配列を増幅することも可能である(Leung et al., Biotechniques, 15: 286(1993)、これは引用することにより本明細書に組み込まれる)が、ネズミIgGのCH1領域およびVHIBACKにアニーリングするプライマCH1Bを使用してVH配列を増幅することができる(上記のOrlandi et al., 1989)。10μlの第1鎖cDNA産物、9μlの10×PCR緩衝液[500mM KCl、100mM Tris-HCl(pH8.3)、15mM MgCl₂、および0.01% (w/v) ゼラチン](Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)を含むPCR反応混合物を30サイクルのPCRにかけることができる。各PCRサイクルは、94℃で1分間の変性、50℃で1.5分間のアニーリング、および72℃で1.5分間の重合から成ることが好ましい。増幅されたVKフラグメントおよびVHフラグメントは、2%アガロース(BioRad, Richmond, CA)で精製することができる。ヒト化V遺伝子の構築に使用するオリゴA(149-mer)およびオリゴB(140-mer)を自動Cycle one Plus DNAシンセサイザ(Milligen Bioresearch)で合成する方法に関し

ては実施例3を参照されたい。

Igプロモーター、シグナルペプチド配列、およびVK PCR産物のフレーム内連結を促進するのに便利な制限部位を含むpBR327ベースのステージングベクターVKpBRなどのステージングベクターにVKのPCR産物をサブクローニングすることができる。pBluescriptベースのVH_pBSなど、類似したステージングベクターにVHのPCR産物をサブクローニングすることができる。それぞれのPCR産物を含む個々のクローンを、たとえば、引用することにより本明細書に組み込まれるSanger et al., Proc Natl Acad. Sci., USA, 74: 5463 (1977)の方法で配列決定することも可能である。

本明細書に記載のDNA配列は、あらゆる対立遺伝子、ならびに自然発生のも

のであろうと誘導されたものであろうと、突然変異体およびその変種を含むものと考えるべきである。

以下に記載の通り、2種類のプラスミドを適切な細胞、例えば骨髄腫Sp2/0-Ag 14に共トランスフェクトして、ハイグロマイシン耐性のコロニーを選択し、上清液のc LL 2抗体産生またはh LL 2抗体産生を、例えばELISA法でモニタリングすることができる。

トランスフェクション、およびELISAによる抗体分泌クローンの分析を次の様に実施することができる。引用することにより本明細書に組み込まれるCo et al., J, Immunol., 148: 1149 (1992) に従って、約 $10\ \mu\text{g}$ のhLL2pKh (軽鎖発現ベクター) および $20\ \mu\text{g}$ のhLL2pG1g (重鎖発現ベクター) を使用して 5×10^6 SP2/0骨髄腫細胞をエレクトロポレーション (BioRad, Richmond, CA) でトランスフェクトすることができる。トランスフェクション後、96ウェル微量滴定プレートの完全HSFM培地 (GIBCO, Gaithersburg, MD) 中、 37°C 、5% CO₂で細胞を成長させることができる。最終ハイグロマイシン濃度 $500\ \mu\text{g/ml}$ でハイグロマイシン選択培地 (Calbiochem, San Diego, CA) を加えるこ

とによって、2日後に選択過程を開始することができる。コロニーは一般にエレクトロポレーション後2~3週間で出現する。さらに分析するため、培養を拡大することができる。

キメラ重鎖またはヒト化重鎖の分泌陽性であるトランスフェクトマ・クローンは、ELISA分析で同定することができる。簡単に記述すると、トランスフェクトマ培養の上清サンプル ($100\ \mu\text{l}$) を、F(ab)₂フラグメント特異的抗体であるヤギ抗ヒト (GAH)-IgG (Jackson ImmunoResearch, west Grove, PA) で予め被覆したELISA微量滴定プレートに三重に加える。プレートを室温で1時間インキュベートする。洗浄緩衝液 (0.05%ポリソルベート20を含有するPBS) で3回洗浄することにより、非結合タンパク質を除去する。Fcフラグメント特異的抗体であるカラシペルオキシダーゼ (HRP) 結合GAH-IgG、(Jackson ImmunoResearch, west Grove, PA) をウエルに加える ($\times 10^4$ 希釈し、非結合抗体をえた抗体ストック $100\ \mu\text{l}$ を最終濃度 $1.0\ \mu\text{g/ml}$ まで)

。1時間インキュベートした後、プレートを、一般には3回、洗浄する。反応溶液[100μl、167μgのオルトフェニレンジアミン(OPD)(Sigma, St. Louis, MO)を含有する、PBS中0.025%過酸化水素]をウェルに加える。暗所で30分間発色させる。50μlの4N HCl溶液を各ウェルに加えることによって反応を停止してから自動ELISA読取り装置(Bio-Tek instruments, Winooski, VT)により490nmで吸光度を測定する。非関連キメラ抗体標準(Scotgen, Ltd., Edinburg, Scotlandから入手可能)を基準にして結合キメラ抗体を測定する。

次の様に細胞培養培地から抗体を分離することができる。トランスフェクトマ培養を無血清培地に適合させる。キメラ抗体產生用に、HSFMを使用してローラーボトルで500ml培養として、細胞を成長させる。培養を遠沈し、上清を0.2ミクロン膜を通過させて濾過する。濾過した培地を、流量1ml/minでタン

パク質Aカラム(1×3cm)を通過させる。カラムの約10培量のPBSで樹脂を洗浄し、10mMEDTAを含有する0.1Mグリシン緩衝液(pH3.5)でタンパク質A結合抗体をカラムから溶出させる。10μlの3M Tris(pH8.6)が入っている試験管に1.0mlの分画を採取して、280/260nmの吸光度からタンパク質濃度を決定する。ピーク分画をプールしてPBSに対して透析を行い、例えばCentricon 30(Amicon Beverly, MA)で抗体を濃縮する。前記同様、ELISAで抗体濃度を決定し、その濃度をPBSで約1mg/mlに調整する。通常通り、0.01%(w/v)アジ化ナトリウムを保存料としてサンプルに加える。

このようにして分離されたmLL2抗体、cLL2抗体およびhLL2抗体の比較結合アフィニティを直接ラジオイムノアッセイで測定する。クロラミンT法(例えば、引用することにより本明細書に組み込まれるGrennwood et al., Bioc hem. J., 89: 123(1963)を参照されたい)を用いてmLL2を¹³¹Iまたは¹²⁵Iで標識することができる。一般に、ヨウ素標識抗体の比活性を約10μCi/μgに調整する。反応培地(1%ウマ血清および100μg/mlゲンタマイシンを加えたHSFM)を使用して、非標識抗体および標識抗体を適切な濃度に稀釀する。適

切な濃度の標識抗体と非標識抗体の両者を、合計体積を $100\mu l$ にして反応試験管に一緒に加える。Raji細胞培養のサンプルを採取して細胞濃度を測定する。培養を遠沈し、収集した細胞を反応培地で1回洗浄した後、最終濃度が約 10^7 細胞/mlとなるように反応培地に再懸濁する。あらゆる手順を $4^\circ C$ の寒冷条件で実施する。細胞浮遊液 $100\mu l$ を反応試験管に加える。反応試験管を定期的に穏やかに振とうさせながら、反応を $4^\circ C$ で2時間行って細胞を懸濁させる。反応期間後、 $5ml$ の洗浄緩衝液（1%BSAを含有するPBS）を各試験管に加える。浮遊液を遠沈し、さらに $5ml$ の洗浄緩衝液で細胞ペレットを2回洗浄する。遠沈後、細胞ペレットに残っている残存放射能の量を γ カウンタ（Minaxi, Packard

Instruments, Sterling, VA）で測定する。

フローサイトメトリ分析で評価すると、Fc部分が欠けている種々の濃度のmLL2 F(ab)₂フラグメントを競合物質として使用して、混合により適合化した抗体および完全にヒト化した抗体のRaji細胞表面抗原結合アフィニティを、cLL2と比較することができる。フローサイトメトリーで、FITC標識抗ヒトFc特異的抗体により、ヒトFc部分を担持する残留表面結合LL2抗体（cLL2および混合適合化(mix-and-match)LL2）を検出することができる。混合適合化LL2抗体がcLL2と類似した抗原結合アフィニティを示す場合、軽鎖と重鎖の両者をヒト化するための最初のデザインはmLL2免疫反応性を保持すると結論を下すことができる。

引用することにより本明細書に組み込まれるPirker et al., J. Clin. Invest., 76: 1261 (1985) の手順に実質的に従って、mLL2抗体、cLL2抗体およびhLL2抗体の標的細胞内へのインターナリゼーション後に蛍光標識が可能である。培養Raji細胞を遠沈し、細胞を約 5×10^6 細胞/mlの濃度まで新鮮な培地に懸濁させる。96ウェル微量滴定プレートの各ウェルに、 $100\mu l$ の細胞浮遊液を加える。すべての反応を同時に停止させるため、体積 $100\mu l$ の $40\mu g/ml$ 抗体を反応ウェルに一定間隔で加える。プレートを $37^\circ C$ 、CO₂細胞培養インキュベータ内でインキュベートする。インキュベーションの終わりに冷1

% F C S / P B S で 3 回洗浄することにより非結合抗体を除去する。次に 1 ml の Formaid-Fresh [10 % ホルマリン溶液 (Fisher, Fair Lawn, NJ)] で細胞を室温で 15 分間処理する。洗浄後、測定する抗体がネズミ、キメラ、あるいはヒト化であるかどうかによって、F I T C 標識ヤギ抗マウス抗体 (Tago, Burlingame, CA) または F I T C 標識ヤギ抗ヒト抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) で処理して、細胞表面または細胞内部のいずれかに存在する抗体を検出する。B H - 2 蛍光顕微鏡 (Olympus, Lake Success, NY) を使用して蛍光分布を評価す

る。Opreskoら (J. Biol. Chem., 262: 4116 (1987)) に従って、放射性ヨード標識抗体をトレーサとして使用して抗体インターナリゼーション速度を測定することができる。簡単に記述すると、1 % ヒト血清を含有する DMEM 培地 0.5 ml の中で、放射標識抗体 (1×10^4 cpm) を Raji 細胞 (1×10^6 細胞/ml) と共に 4 °C で 2 時間インキュベートする。反応間隔後、0.5 ml の DMEM 培地で 3 回洗浄することにより、非特異的に結合した抗体を除去する。インターナリゼーションを測定するため、各々の反応試験管に 0.5 ml の DMEM 培地を加えて、浮遊液を 37 °C でインキュベートする。三重の細胞を一定間隔で取り出し、即座に氷浴で冷却してそれ以上のインターナリゼーションを停止させる。細胞を 1000 × g で、4 °C で 5 分間遠沈する。上清を除去して放射能をカウントする。寒冷条件下で、pH 3.0、1 ml の 0.1 mM 酢酸 / 0.1 mM グリシン緩衝液で 8 分間処理することにより、表面に結合した放射能を除去する。酸処理で除去された放射能、および細胞と結合して残存している放射能を測定した。インターナリゼーション CPM / 表面 CPM の比率を時間に対してプロットし、勾配からインターナリゼーションの速度を決定した。

オリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発およびクローン化 DNA の突然変異のための関連技術に関する詳細なプロトコルは周知である。例えば、上記 Sambrook らの文献と Ausubel らの文献を参照されたい。

従来の部位指向性オリゴヌクレオチド突然変異誘発を使用して、Asn 結合グリコシル化部位を抗体に導入することも可能である。例えば、κ タンパク質の 1

8位のAsnを導入するためには、コドン18をAGGからAACに変化させてもよい。これを遂行するには、チミンの代わりに少数のウラシルを含むDNA分子を得るために、抗体軽鎖配列を含む1本鎖DNA鑄型を、E. coliの適当な菌株（例えば、dut-ung-）から調製する。このようなDNA鑄型は、M13クローンングまたはSP6プロモーターを使用して、in vitro転写で得ることもできる。

例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学における現行プロトコル）、John Wiley & Sons, NY, 1987を参照されたい。突然変異した配列を含むオリゴヌクレオチドを通常通り合成し、1本鎖鑄型にアニーリングして、生成物をT4 DNAポリメラーゼおよびT4 DNAリガーゼで処理すると、2本鎖DNA分子が生じる。野生型E. coli (dut+ung+) 細胞を2本鎖DNAで形質転換すると、突然変異DNAが効率よく回収される。

その代わりに、望み通りの突然変異を含むオリゴヌクレオチドを、VL鎖の可変領域のプライマおよびDNAクローンとして使用するか、関心事の抗体を産生する細胞由来のRNAを鑄型として使用して、Asn連結したグリコシル化部位を抗体軽鎖に導入することもできる。Huse、Antibody Engineering: A Practical Guide(抗体エンジニアリング：実践ガイド)のBoerrebaeck編、W.H. Freeman & Co., PP. 103-120, 1992も参照されたい。例えば、製造業者の説明書に従ってTRANSFORMER™キット(Clontech, Palo Alto, CA)を使用して、部位指向性突然変異誘発を実施することができる。

その代わりに、望み通りの突然変異を含む、相互にプライミングするオリゴヌクレオチドを含む抗体鎖を合成することによって、グリコシル化部位を導入することができる。例えば、引用することにより本明細書に組み込まれるUhlmann, Gene 71: 29(1988); Wosnick et al., Gene 60: 115(1988); 上記のAusubelらの文献を参照されたい。

上記一般記述は、抗体の18位のAsnグリコシル化部位の導入に言及しているが、軽鎖の他所のAsn連結したグリコシル化部位、または重鎖可変領域の場合でも導入することが可能なことは、当業者の心に浮かぶであろう。

以下に記述する代表的な実施態様は、本発明を説明するために使用するに過ぎ

ない。当業者は、本材料の変化は、請求の範囲に記載されている発明の広い全般的な範囲内に属することを認めるであろう。本明細書で言及したすべての引用文献の内容は、引用することにより本明細書に組み込まれる。

実施例 1

LL2モノクローナル抗体をヒト化するためのヒト・フレームワークの選択 および配列デザイン

引用することにより組み込まれるKabatデータ(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学的に重要なタンパク質の配列)、第5版、連邦保険福祉省、米国政府印刷局、Washington, D.C.)でLL2のネズミ可変(V)領域フレームワーク(FR)をヒト抗体の可変領域フレームワークと比較することにより、ヒトREI配列(第1図A、配列識別番号6)およびEU配列(第1図B、配列識別番号9および10)は、それぞれLL2のVKドメインおよびVHドメインのフレームワークと最高級の配列ホモロジーを示すことが確認された。したがって、LL2 VKおよびLL2 VHのCDRを移植するヒトフレームワークとして、それぞれREI FRおよびEU FRを選択した。しかし、LL2重鎖のヒト化では、EUの配列ではなく、むしろNEWMのFR4配列を使用してEU FR4配列を置き換えた。コンピュータモデリング試験結果(第2図Aおよび第2図B)に基づいて、ヒト化FR配列のデザインは、結果として得られる抗体のアフィニティおよび特異性に影響を及ぼすと考えられる、潜在的CDR接触があるネズミFR残基を保持した(第1図)。

2つのバージョンのヒト化重鎖を構築した。第1のバージョン(hLL2-1、配列識別番号9)で、グルタミン(Q)をアミノ酸5位(Kabatナンバリング)に導入してPstI制限部位を含め、ステージングベクターへのグルタミンのサブクローニングを促進した。オリゴ指向性突然変異誘発により、このネズミ残基をhLL2-2(配列識別番号8)のヒトEU残基バリン(V)に変換した。もとのネズミ κ 鎖可変配列で、18~20位(第1図、配列識別番号2)で潜在的N結合グリコシル化部位が同定され、炭水化物付加に使用されたことに注目すべきで

ある。このグリコシル化部位は、LL2軽鎖のヒト化に使用したREI-FR配列に含まれていなかった。

より多くのオリゴヌクレオチドの詳細に関しては、実施例3を参照されたい。

実施例2

LL2重鎖可変領域およびLL2軽鎖可変領域の

PCRクローニングおよび配列解明

mLL2(1gG2a)の重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VK)の両者を、一般には上記通りに、さらに詳細には以下の実施例3の記載通りに、DNAプライマを使用してPCRクローニングで獲得した。PCRは突然変異させる傾向があるため、重鎖または軽鎖のいずれかの多様な個々のクローン可変領域を、6クローンについて決定し、同一であることを確認してからキメラ抗体の構築に使用した。

Igプロモーターと、シグナルペプチド配列と、VK PCR産物のフレーム内連結反応の促進に便利な制限部位とを含む、pBR327ベースのステージングベクターであるVKpBRに、VKのPCR産物をサブクローニングした(第3図A)。VHのPCR産物は、類似したpBluescriptベースのステージングベクターであるVHpBSにサブクローニングした(第3図B)。

上記と同様、それぞれのPCR産物を含む少なくとも6個の個々のクローンの配列を、上記Sangerら(1977)の方法に従って決定した。全てが同一配列を担持していることが証明され、LL2 VK(配列識別番号1)は第4図Aから、またLL2 VH(配列識別番号3)は第4図Bからわかるように、その各々の配列が解明された。欠損突然変異は、VK領域およびVH領域をコードする配列内で1つも同定されなかった。LL2のPCR增幅可変領域配列とKabatデータベース(Kabatら、上記)との比較によって、LL2のVK配列およびVH配列は、それぞれサブグループ5および2Bに属することがわかる。ドメイン内ジスルフ

ィド結合のためのCysなど、重要な残基は適切な部位に保持された。

VKのFR1フレームワークで、N結合炭水化物付着部位、Asn-Val-Thrが1

8～20位で同定され（第4図A、配列識別番号2）、LL2のVKはグリコシル化されていることが示唆された。以下に詳述する通り、還元条件でのSDS-PAGE分析で、このAsnグリコシル化部位は実際に炭水化物付加に使用されていることが証明された。しかし、可変領域にグリコシル化部位が存在することにより、抗体の免疫反応性は影響を受けないようである。競合的ラジオイムノアッセイでmLL2の免疫反応性とcLL2の免疫反応性を比較すると、2つの抗体の活性はほぼ同じであった。

実施例3

ヒト化V遺伝子のPCR／遺伝子合成

hLL2 VHドメイン用にデザインされた配列、長いオリゴヌクレオチドおよびPCRによるhLL2 VHドメインの構築、hLL2 VHドメインを含むステージングベクターVH_pBSを、第6図に示したスケッチにまとめる。

hLL2 VHドメインの構築に関しては、オリゴA（149-mer）およびオリゴB（140-mer）を自動CYCLONE PLUSTM DNAシンセサイザ（Milligen Bioresearch）で合成した。

オリゴA（下記配列識別番号10）は、nt 24～172に相補的なhLL2 VHドメインのマイナス鎖を表す。

配列識別番号10

5' - TAT AAT CAT TCC TAG GAT TAA TGT ATC CAA TCC ATT CCA
GAC CCT GTC CAG GTG CCT GCC TAG CCC AGT GCA GCC AGT AGC
TAG TAA AGG TGT AGC CAG AAG CCT TGC AGG AGA CCT TCA CGT
ATG ACC CAG GTT TCT TGA CTT CAG CC-3'

オリゴB（下記配列識別番号11）は、nt 180～320に相補的なhLL

2 VHドメインのマイナス鎖を表す。

配列識別番号11

5'-CCC CAG TAG AAC GTA ATA TCC CTT GCA CAA AAA TAA AAT
GCC GTG TCC TCA GAC CTC AGG CTG CTC AGC TCC ATG TAG GCT
GTA TTG GTG GAT TCG TCT GCA GTT ATT GTG GCC TTG TCC TTG
AAG TTC TGA TT-3'

オリゴAおよびオリゴBを濃水酸化アンモニウム処理により支持体から切断し、保護解除した。サンプルを真空乾燥して (SpeedVac, Savant, Farmingdale, NY) 、水100 μlに再懸濁した後、CHROMOSPIN-100TMカラム (Clonetech, Palo Alto, CA) による遠心分離で不完全オリゴマ (100-mer未満) を除去してからDNAオリゴマをPCRで増幅した。オリゴAおよびオリゴBを別々に増幅してPCRクローニングするため、横側に位置するプライマすべてを、本質的に上記Sambrookら (1989) の方法に従って、SDS-PAGEで精製した。

10 μlの10×PCR緩衝液 (500 mM KCl、100 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.3、15 mM MgCl₂) および、5単位のAMPLIQAQTM DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) の存在下、5 μlの5 μMオリゴ配列識別番号12

5'-CCA GCT GCA ATC AGG GCC TGA AGT CAA GAA ACC TG-3'
およびオリゴ配列識別番号13

5'-AAG TGG ATC CTA TAA TCA TTC CTA GGA TTA ATG-3'
を加えることによって、CHROMOSPIN精製オリゴAから、1 μlのサンプル・ストックを100 μlの反応体積でPCR増幅した。この反応混合物を、94 °Cで1分間の変性、50 °Cで1.5分間のアニーリング、および72 °Cで1.5分間の重合から成る30サイクルのPCR反応に供した。

同様の条件で、プライマ・ペア配列識別番号14

5'-TAA TCC TAG GAA TGA TTA TAC TGA GTA CAA TCA GAA CTT
CAA GGA CCA G-3'
および配列識別番号15

5'-GGA GAC GGT GAC CGT GCC TTG GCC CCA GTA GAA CGT

AGT AA-3'

によりオリゴBをPCR増幅した。

オリゴAおよびオリゴBの二本鎖PCR増幅産物をゲル精製し、PstI/AvrII（オリゴAのPCR産物）およびBstEII/AvrII（オリゴBのPCR産物）で制限消化して、重鎖ステージングベクターVhpbSの相補的PstI/BstEII部位にサブクローニングすると、最終的なヒトIgG1重鎖発現ベクターhLL2pG1gが得られた。

ヒト化VK配列の全長DNAを構築する場合、オリゴE（150-mer）およびオリゴF（121-mer）を上記のように合成した。

オリゴE配列識別番号16

5'-CCT AGT GGA TGC CCA GTA GAT CAG CAG TTT AGG TGC TTT
CCC TGG TTT CTG GTG GTA CCA GGC CAA GTA GTT CTT GTG ATT
TGC ACT GTA TAA AAC ACT TTG ACT GGA CTT ACA GCT CAT AGT
GAC CCT ATC TCC AAC AGA TGC GCT CAG-3'

は、nt31~180に相補的なヒト化VKドメインのマイナス鎖を表し、この配列をオリゴ配列識別番号17

5'-GAC AAG CTT CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCA TCT CTG AGC
GCA TCT GTT GGA G-3'

およびオリゴ配列識別番号18

5'-AGA GAA TCG CGA AGG GAC ACC AGA TTC CCT AGT GGA TGC
CCA GTA-3'

でPCR増幅した。

オリゴF配列識別番号19

5'-GCA CCT TGG TCC CTC CAC CGA ACG TCC ACG AGG AGA GGT
ATT GGT GAC AAT AAT ATG TTG CAA TGT CTT CTG GTT GAA GAG
AGC TGA TGG TGA AAG TAA AAT CTG TCC CAG ATC CGC TGC C-3'

は、nt 208~327に相補的なヒト化LL2 VKドメインのマイナス鎖を表し、この配列を、オリゴ同定配列番号20

5'-GAC AAG CTT TCG CGA TTC TCT GGC AGC GGA TCT GGG ACA G-3'
およびオリゴ配列識別番号21

5'-GAC CGG CAG ATC TGC ACC TTG GTC CCT CCA CCG-3'
でPCR增幅した。

オリゴEおよびオリゴFのPCR増幅産物をゲル精製して、それぞれPvuII/NruIおよびNruI/BglIIIで制限消化した。2つのPCRフラグメントEおよびFをNruI部位で連結し、軽鎖ステージングベクターであるVKpBRの相補的PvuI/BcII部位に連結した。ヒト化VK配列をpKhにサブクローニングすると最終的なヒトκ鎖発現ベクターであるhLL2pKhが生じた。

ヒト化抗体を発現させるために、約10μgの直鎖化hLL2pKhと約20μgの直鎖化hLL2pG1gを使用して、エレクトロポレーションにより5×10⁶のSP2/0細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトマウスを500μg/mlのハイグロマイシンで選択し、分泌された抗体を1×3cmのタンパク質Aカラムで精製した。精製抗体をCentricon 30遠心分離機で濃縮した後、ELISAで抗体濃度を測定した。0.1% (w/v) アジ化ナトリウムを保存料として含有するPBS緩衝液で最終抗体濃度を1mg/mlに調節した。

第1図で、ネズミLL2 VKドメインとヒト化LL2 VKドメイン（第1図A、配列識別番号2および6）との間、およびネズミLL2 VHドメインと

ヒト化LL2 VKドメイン（第1図B、配列識別番号4、9、8）との間で、アミノ酸配列を比較する。VK鎖では、ヒトREIフレームワーク配列をすべてのFRに使用した。VH鎖では、ヒトEUフレームワーク配列をFR1~3に使用し、NEWM配列をFR-4に使用した。マウスのFR配列と異なるヒトFR配列のみを示す。星印は、対応する位置のヒトFR配列と異なるネズミFR配列を示す。この星印の位置のネズミの残基は、ヒト化構造においても保持された。CDRは枠で囲われている。

第4図A（配列識別番号1および2）に、ネズミLL2 VKドメインの二本

鎖DNAおよび対応するアミノ酸配列（1文字コードで示す）を示す。CDR1～3のアミノ酸配列は枠で囲われている。第4図B（配列識別番号3および4）に、対応するVHを表示する。

第5図A（配列識別番号5および6）および第5図B（配列識別番号7および8）に、それぞれヒト化LL2 VKおよびLL2 VHの二本鎖DNA配列およびアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列は1文字コードで表し、CDRアミノ酸配列は枠で囲ってある。

実施例4

キメラLL2抗体の構築、発現および精製

HindIIIおよびBamHIによる二重制限消化により、それぞれLL2VKpBRおよびLL2VHPBSから、LL2のVK配列およびVH配列を含むフラグメントを、プロモーター配列およびシグナル・ペプチド配列と共に切除した。約600bpのVKフラグメントを、哺乳類発現ベクターpKhのHindIII/BamHI部位にサブクローニングした（第3図A）。pKhは、ヒトκ定常領域のゲノム配列、Igエンハンサー、κエンハンサーおよびハイグロマイシン耐性遺伝子を含むpSVhygベースの発現ベクターである。同様に、pG1g、ヒトIgG1定常領域のゲノム配列、Igエンハンサーおよびキサンチングアミニン・ホスホリボ

シルトランスフェラーゼ(gpt)遺伝子を担持するpSVgptベースの発現ベクター（第3図B）の対応するHindIII/BamHI部位に約800bpのVHフラグメントをサブクローニングした。最終発現ベクターは、それぞれLL2pKhおよびLL2pG1gと呼ばれる。

2つのプラスミドをエレクトロポレーションによりSp2/0-Ag14細胞に共トランスフェクトしてハイグロマイシン耐性を選択した。選択で生き残ったコロニー由来の上清のキメラ抗体分泌をELISA検定でモニタリングした（上記参照）。トランスフェクション効率は約1～10×10⁶細胞であった。終末培養での抗体発現レベルは、0.10/μg/ml未満から2.5/μg/mlまでの範囲で様々であった。

第7図は、タンパク質A精製したmLL2（レーン4および7）およびcLL

2（レーン5および8）を、それぞれ還元条件および非還元条件でSDS-PAGE分析した結果示す図である。「HMW」は高分子量タンパク質マーカーを表し、「LMW」は低分子量マーカーを表す。mLL2の軽鎖もcLL2の軽鎖も（レーン4および5）主としてダブルレット・バンドとして泳動し、予期されたみかけの分子量より大きかった。cLL2のヒトκ定常領域は潜在的グリコシル化部位を含むことが判明しており、LL2 VKドメインのFR1領域で同定された潜在的グリコシル化部位が利用されたと推理される。

第8図は、異なるバージョンのhLL2抗体およびcLL2抗体を、還元条件および非還元条件でSDS-PAGE分析した結果を示す図である。上記と同様、LMWおよびHMWは分子量マーカーである。レーン3および6は、cLL2抗体である。レーン4および7は、VHドメインにネズミFR残基が7個含まれているhLL2である（hLL2-1）。レーン5および8は、VHドメインにネズミFR残基が6個含まれているhLL2である（hLL2-2）。ヒト化軽鎖はキメラ軽鎖と比較して、より迅速に、しかもより不連続のバンドとして泳動する。

第9図は還元および非還元の両条件で、混合適合化(mix-and-match)抗体およびcLL2抗体およびhLL2抗体のSDS-PAGE分析成績を示す図である。レーン1および2は、分子量マーカーである。レーン3および7はcLL2である。レーン4および8は、ヒト化軽鎖およびキメラ重鎖を含む混合適合化したものであり[（hL/cH）LL2]。レーン5および9は、キメラ軽鎖およびヒト化重鎖（バージョン1）であり[（cL/hH）LL2-1]。レーン6および10はキメラ軽鎖およびヒト化重鎖（バージョン2）である[（cL/hH）LL2-2]。ヒト化LL2バージョン1はVHドメインにネズミFR残基7個を含むが、バージョン2はVHドメインにネズミFR残基6個を含む。（hL/cH）LL2（レーン4）の軽鎖の位置は他の位置と異なることは注目に値し、ヒト化LL2軽鎖への炭水化物付着がないことが示唆される。

実施例5

cLL2抗体のRaji細胞表面抗原への結合

競合細胞結合分析を実施して、親mLL2を基準としたcLL2の免疫反応性を評価した。プローブとして¹³¹I標識mLL2(0.025 μg/ml)を使用して、Raji細胞を抗体と共にインキュベートし、細胞結合した標識mLL2の量から細胞への相対的結合を求めた（上記参照）。第10図に示した競合分析からわかるように、mLL2抗体もcLL2抗体も類似した結合活性を示した。

フローサイトメトリに基づく第2競合分析で結果を確認した。簡単に記述すると、前述と同様、Raji細胞を使用して、前述と同様、1つの抗体濃度を他と比較して変化させながら、結合したmLL2またはcLL2の量を、FITC標識抗マウスFc抗体または抗ヒトFc抗体で測定し、続いてフローサイトメトリを使用して分析する。

実施例6 hLL2抗体のRaji細胞への結合

実施例5と類似した実験で、混合適合化LL2またはヒト化LL2の異なる3種類の組み合わせの抗原結合アフィニティとcLL2の抗原結合アフィニティを、フローサイトメトリで比較した。

簡単に記述すると、1%FCSおよび0.01%アジ化ナトリウムを加えた最終体積100 μlのPBS緩衝液中に様々な濃度のmLL2 F(ab')₂フラグメント（競合体として）が存在する条件下、1 μgのcLL2抗体、混合適合化cLL2抗体、hLL2-1抗体またはhLL2-2抗体を10⁻⁸のRaji細胞と共にインキュベートした。混合液を4℃で30分間インキュベートした後、PBSで3回洗浄して非結合抗体を除去した。抗体にヒトFc部分が存在することを利用して、20×希釈FITC標識ヤギ抗ヒトIgG1、Fcフラグメント特異的抗体（Jackson ImmunoResearch, West Grove PA）を加えることにより、抗体の結合レベルを評価した。細胞をPBSで3回洗浄し、FACSCAN蛍光活性化細胞選別装置（Becton-Dickinson, Bedford, MA）で蛍光強度を測定した。結果を第11図Aに示す。

同じ方法を使用して、cLL2を2つのバージョンのhLL2と比較した（第11図B）。

第11図AおよびBに示した結果から、c LL 2の免疫反応性は、ヒト化抗体または混合適合化抗体の免疫反応性と同様または同じであることが明らかである。c LL 2とm LL 2の比較（第10図）も考慮すると、得られたキメラVKおよびVHならびにヒト化VKおよびVHの配列の信憑性が証明され、c LL 2およびh LL 2の機能性が確認される。

実施例7

Raji細胞によるm LL 2およびc LL 2のインターナリゼーション

LL 2抗体独特の特性は、Raji細胞に結合するとすぐに速やかにインターナライズすることである（上記、Shihら、1994）。インターナリゼーション後のネズ

ミLL 2は、速やかにゴルジ装置に輸送され、そこから広く様々な生化学物質の分解を担当する細胞小器官であるリソソームに輸送される（Keisariら、Immunochem., 10:565 (1973)）。

抗体インターナリゼーション速度は、上記Opreskoら（1987）に従って測定した。細胞内CPM／表面CPMの比率は、時間の関数として求めた。

LL 2抗体インターナリゼーション速度は、1%ヒト血清を含有するDMEM緩衝液0.5ml中で、放射標識LL 2抗体 (1×10^6 cpm) を 0.5×10^6 Raji細胞と共に4°Cで2時間インキュベートすることによって測定した。Fc受容体を介した非抗原特異的インターナリゼーションを排除するかまたは最小限に抑えるために、Raji細胞表面Fc受容体を飽和させるため、過剰なヒト血清が含まれていた。4°CのDMEM 0.5mlで3回洗浄することにより、結合されていない放射標識LL 2抗体を細胞から除去した。次に細胞を37°Cでインキュベートし、一定時間後に、インターナリゼーションを停止させるために細胞浮遊液の一部を移して氷で冷却した。3つの部分標本中の細胞を $1,000 \times g$ で5分間遠沈して分離し、表面に結合している放射標識LL 2を、1mlの0.1M酢酸グリシン緩衝液、pH 3を用いて4°Cで8分間除去した。このようにして得られた放射能（表面CPM）および細胞内に残存している放射能（細胞内CPM）を測定した。インターナリゼーション速度を、細胞内：表面放射能比のプロットの勾配から時間の関数として算出した。

第12図からわかるように、mLL2抗体、cLL2抗体、cLL2Q抗体およびhLL2抗体は、類似した速度でインターナライズされた ($K_e = 0.170$ (mLL2) ~ 0.1221 (cLL2Q, NVTからQVTへの突然変異))。この数値から、10分で表面結合抗体の約50%がインターナライズされると考えられた。結果から、mLL2抗体のキメラ化もヒト化も脱グリコシル化も、インターナリゼーション速度を低下させないことがわかる。

mLL2、cLL2およびhLL2のインターナリゼーションの様式も、本明細書に記載のFITC標識第2抗体プローブを使用して、時間経過ベースで蛍光検鏡法によりモニタリングした。両抗体のインターナリゼーションは、測定可能な最も初期の時点で確認された。5分で、抗体は細胞表面上でも、膜に隣接した領域内に細胞質小胞としてインターナライズされた状態でも見られた。インキュベーション後15分で、膜内周囲に散在した細かい点が、ゴルジ装置であると考えられる位置の顆粒群に溶けこみ始めた。30分間インキュベートした後、さらに多くの抗体がインターナライズされるにつれて、抗体が分解されるリソソームであると考えられる離ればなれの位置に、群れをなした抗体が再分布するのが確認された。インキュベーション後2時間に、抗体のほとんどが細胞内部で認められた。LL2を氷上で20分間インキュベートすると、強い表面染色のみが確認された。mLL2もcLL2も、類似した様式でインターナライズされた。非関連コントロール・ヒト化抗体は鈍感な表面染色にすぎないことが証明されたため、LL2のインターナリゼーションは抗原-抗体結合と特に関連していた。

A103抗体（あらゆるヒト上皮細胞の表面に結合するが、効率よくインターナライズしないIgG2a抗体（Mattesら、Hybridoma, 2: 253(1983)）は、2時間まで強い膜染色を示したが、抗トランスフェリン受容体抗体（5F9）はLL2と同様、すみやかにインターナライズした。

実施例8

LL2VK配列のFR1領域におけるグリコシル化部位の役割

特に発明としての関心事は、LL2 NVT軽鎖配列のFR1領域内の18~20位にあるAsnグリコシル化部位の同一性である（第4図A配列識別番号2）

。上記の通り、還元条件でのSDS-PAGE分析から、Asnグリコシル化部位は炭水化物付加に使用されることが示唆される。

実施例8では、18～20位の炭水化物部分が軽鎖の機能的活性に及ぼす影響

を試験した。

ネズミLL2軽鎖およびキメラLL2軽鎖をエンドグリコシダーゼFで(+)処理するか、通常通りエンドグリコシダーゼFを使用せずに(-)処理して、その抗体産物を還元条件および非還元条件でSDS-PAGEにより試験した(第13図)。電気泳動的挙動に関して抗体型間で違いはなかった。両者とも、脱グリコシル化により軽鎖の移動速度が低下した。

脱グリコシル化がmLL2抗体のRaji細胞結合アフィニティに及ぼす影響を図14に示す。エンドグリコシダーゼFで炭水化物を除去しても、結合活性に対する影響はなかった。

AsnをGlnで置き換えてLL2Q VK FR1を作るため、軽鎖の18位に突然変異を導入した。NVTからQVTへの突然変異によって、抗体のグリコシル化が完全に破壊されることがSDS-PAGE分析で証明された。軽鎖VKグリコシル化を伴うcLL2と伴わないcLL2のRaji細胞結合アフィニティを比較すると、炭水化物部分はこれらの細胞への抗体の結合に影響を及ぼさないことが明らかであった。

可変領域に炭水化物部位があることによって、抗体の免疫反応性は影響を受けないと結論を下すことができる。LL2のVK炭水化物部分をCDRから離して置くと、CDRを支持するFR関連の β バレルのボトムループの上に「帽子」を形成することが、コンピュータモデリング試験で示唆された。。

原型のグリコシル化部位を含めずにヒト化すると、ネズミ相対物に匹敵する免疫反応性を持つCDR移植LL2抗体を生じる。

以上の特徴は、グリコシル化部位を使用して、抗体がBリンパ腫細胞または白血球細胞に結合して細胞内にインターナライズする能力を損なわずに治療用試薬または診断用試薬をLL2に結合させることができることを示す。

実施例9

LL2の炭水化物担持部位における結合

可変領域炭水化物分部は、mLL2-mAb、cLL2-mAbおよびhLL2-mAbの機能活性に明らかに関与していないことから、この部分は放射性核種トキシンなどの細胞障害剤または検出剤の付加部位として有利に使用でき、その結果、結合体が細胞表面に結合するのを妨害する可能性がなくなる。

Shihら、米国特許第5,057,313号（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記載の手順を使用して、抗体の酸化炭水化物部分、および種々の薬物、トキシン、キレート形成剤、および検出可能標識のうちの1つ以上と等価である重合キャリアの第一級アルカリアミノ基を介して抗体結合物を調製すると、薬物の複数のコピーを含む、付加グリカン類が欠如したドキソルビシン-デキストラン LL2抗体フラグメントが生じる。cLL2 VK FR1領域に含まれる炭水化物部分は、Asnグリコシル化部位に共有結合するものであった。

1つの合成で、NaIO₄によるデキストランの酸化、NH₂-CH₂-CHOH-CH₂-NH₂によるSchiff塩基形成およびNaBH₄による還元によって、デキストラン（18～40kDa）をアミノデキストランに変換した。次に、無水コハク酸および1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドの存在化、アミノデキストランをドキソルビシン（DOX）と縮合すると、DOXアミノデキストランを生じた。さらに、DOXアミノデキストランを、抗体フラグメントの炭水化物部分をNaIO₄で酸化して生じたLL2 VK FR-1のアルデヒド基と縮合させた。

1つのDOX-LL2調製で、デキストランに付着したDOXの分子数はデキストラン1分子当たり14であり、1分子のF(ab)2当たりのドキソルビシンの分子数は8.9であった。上記Raji細胞結合分析での免疫反応性は、コントロール値の約80%であった。

この結合系は、mLL2抗体に制限されない。比較試験で、DOX 1.5～1.9分子/cLL2分子が結合していた。

結合の可能性は上記実施例でのキャリア・デキストランの使用に制限されない。例えば、LL2 VK FR1領域の炭水化物部分を酸化してアルデヒド基を

生成することができる。このアルデヒド基は、任意の薬物のアミノ基と反応して Schiff塩基を生成することができ、このSchiff塩基は還元されると、アルキルアミン基により抗体に安定に連結する薬物の複数のコピーを作成する。

例えば、薬物がアミノヘキシルDTPA（キレート化剤）である場合、キレート化剤に共有結合したLL2が生成する。キレート化剤を使用して、例えば、診断用または治療用に使用できる可能性がある放射核種や常磁性金属イオンなどを、標的組織に送達することができる。Y-90の47.3%およびIn-111の97.4%がキレート化されている、キレート化剤5.5分子／抗体分子を含むDTPA-LL2結合体が生成された。

上記実施例は本発明の幾つかの実施態様を示すにすぎず、本出願は上記の詳細な実施例によって請求の範囲が制限されるものではないことを強調する。

本出願に引用されたあらゆる出版物および特許は、引用することにより出願に組み込まれる。

配 列 表

(1) 一般的情報 :

(i) 出願人
 (A) 名称 : イムノメディクス, インコーポレイテッド
 (B) 街 : アメリカン・ロード 300
 (C) 市 : モリス・プレインズ
 (D) 州 : ニュージャージー
 (E) 国 : アメリカ合衆国
 (F) 郵便番号 : 07950

(ii) 発明の名称 : B細胞リンパ腫細胞および白血病細胞に特異的な免疫結合体およびヒト化抗体

(iii) 配列の数 : 21

(iv) コンピュータ読取可能な形式
 (A) 媒体 : フロッピーディスク
 (B) コンピュータ : IBM PC 互換器
 (C) オペレーティングシステム : PC-DOS/MS-DOS
 (D) ソフトウェア : PatentIn Release #1.0. Version #1.25

(v) 本出願データ :
 (A) 出願番号 : PCT/US95/09641
 (B) 出願日 : 1995年 8月11日

(vi) 先出願データ :
 (A) 出願番号 : US 08/289,576
 (B) 出願日 : 1994年 8月12日

(2) 配列番号 : 1

(i) 配列の特徴 :
 (A) 配列の長さ : 339塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 二本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :
 (A) 特徴を表す記号 : CDS
 (B) 存在位置 : 1..339

(xi) 配列 : 配列番号 1

GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCA TCT CTG GCT GTG TCT GCA GGA Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly 1 5 10 15	48.
GAA AAC GTC ACT ATG AGC TGT AAG TCC AGT CAA AGT GTT TTA TAC AGT Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser 20 25 30	96
GCA AAT CAC AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 35 40 45	144
TCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGT GTC Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 50 55 60	192
CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGC GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT CTT ACC Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 65 70 75 80	240

ATC AGC AGA GTA CAA GTT GAA GAC CTG GCA ATT TAT TAT TGT CAC CAA Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln 85 90 95	238
TAC CTC TCC TCG TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110	336
CGT Arg	339

(2) 配列番号：2

(i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ： 113アミノ酸
 (B) 配列の型： アミノ酸
 (D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(xi) 配列： 配列番号 2

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly 1 5 10 15
Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser 20 25 30
Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln 85 90 95
Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110

Arg

(2) 配列番号：3

(i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ： 348塩基対
 (B) 配列の型： 核酸
 (C) 鎖の数： 一本鎖
 (D) トポロジー： 直鎖状

(ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号： CDS
 (B) 存在位置： 1..348

(xi) 配列： 配列番号 3

CAG GTC CAG CTG CAG GAG TCA GGG GCT GAA CTG TCA AAA CCT GGG GCC Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ser Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
---	----

TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGC TAC Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30	96
TGG CTG CAC TGG ATA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45	144
GGA TAC ATT AAT CCT AGG AAT GAT TAT ACT GAG TAC AAT CAG AAC TTC Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe 50 55 60	192
AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
GCA AGA AGG GAT ATT ACT ACG TTC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu 100 105 110	336
ACA GTC TCC TCG Thr Val Ser Ser 115	348

(2) 配列番号：4

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 配列の長さ： 116 アミノ酸
 - (B) 配列の型： アミノ酸
 - (D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(xi) 配列： 配列番号 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ser Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30
Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe 50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95
Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu 100 105 110
Thr Val Ser Ser 115

(2) 配列番号：5

- (i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ : 339 塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 二本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :
 (A) 特徴を表す記号 : CDS
 (B) 存在位置 : 1..339

(xi) 配列 : 配列番号 5

GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCA TCT CTG AGC GCA TCT GTT GGA	48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
GAT AGG GTC ACT ATG AGC TGT AAG TCC AGT CAA AGT GTT TTA TAC AGT	96
Asp Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
20 25 30	
GCA AAT CAC AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA	144
Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
35 40 45	
GCA CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGT GTC	192
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50 55 60	
CCT TCG CGA TTC TCT GGC AGC GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT TTC ACC	240
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr	
65 70 75 80	
ATC AGC TCT CTT CAA CCA GAA GAC ATT GCA ACA TAT TAT TGT CAC CAA	288
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln	
85 90 95	
TAC CTC TCC TCG TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA	336
Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	
CGT	339
Arg	

(2) 配列番号 : 6

(i) 配列の特徴 :
 (A) 配列の長さ : 113 アミノ酸
 (B) 配列の型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 6

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
20 25 30	
Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
35 40 45	

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

(2) 配列番号：7

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 348 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎮の数： 二本鎮
- (D) トポロジー： 直鎖状

(ix) 配列の特徴：

- (A) 特徴を表す記号： CDS
- (B) 存在位置： 1..348

(xi) 配列： 配列番号 7

CAG GTC CAG CTG GTC CAA TCA GGG GCT GAA GTC AAG AAA CCT GGG TCA	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGC TAC	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
TGG CTG CAC TGG GTC AGG CAG GCA CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT	144
Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
GGA TAC ATT AAT CCT AGG AAT GAT TAT ACT GAG TAC AAT CAG AAC TTC	192
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe	
50 55 60	
AAG GAC AAG GCC ACA ATA ACT GCA GAC GAA TCC ACC AAT ACA GCC TAC	240
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCA TTT TAT TTT TGT	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys	
85 90 95	
GCA AGA AGG GAT ATT ACT ACG TTC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACG GTC	336
Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	
100 105 110	
ACC GTC TCC TCG	348
Thr Val Ser Ser	
115	

(2) 配列番号：8

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 116アミノ酸
- (B) 配列の型： アミノ酸
- (D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(xi) 配列： 配列番号 8

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1					5				10					15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr															
20 25 30															
Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile															
35 40 45															
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe															
50 55 60															
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr															
65 70 75 80															
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys															
85 90 95															
Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val															
100 105 110															
Thr Val Ser Ser															
115															

(2) 配列番号： 9

- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ： 116アミノ酸
- (B) 配列の型： アミノ酸
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 9

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
1					5				10				15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr															
20 25 30															
Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile															
35 40 45															
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe															
50 55 60															
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr															
65 70 75 80															
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys															
85 90 95															
Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val															
100 105 110															
Thr Val Ser Ser															
115															

(2) 配列番号：10

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 149 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 10

TATAATCATT CCTAGGATTA ATGTATCCAA TCCATTCCAG ACCCTGTCCA GGTGCCTGCC	60
TGACCCAGTG CAGCCAGTAG CTAGTAAAGG TGTAGCCAGA AGCCTTGCAG GAGACCTTCA	120
CTGATGACCC AGGTTTCTTG ACTTCAGCC	149

(2) 配列番号：11

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 134 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 11

CCCCAGTAGA ACGTAATATC CCTTGCACAA AAATAAAATG CCGTGTCCIC AGACCTCAGG	60
CTGCTCAGCT CCATGTAGGC TGTATTGGTG GATTGTCCTG CAGTTATTGT GGCTTGTCC	120
TTGAAGTTCT GATT	134

(2) 配列番号：12

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 38 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 12

CCAGCTGCAG CAATCAGGGG CTGAAGTCAA GAAACCTG	38
---	----

(2) 配列番号：13

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 33 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 13

AAGTGGATCC TATAATCATT CCTAGGATTA ATG	33
--------------------------------------	----

(2) 配列番号：14

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ : 49 塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 1 4

TAATCCTAGG AATGATTATA CTGAGTACAA TCAGAACTTC AAGGACCAG

49

(2) 配列番号 : 1 5

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 44 塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 1 5

GGAGACGGTG ACCGTGGTGC CTTGGCCCCA GTAGAACGTA GTAA

44

(2) 配列番号 : 1 6

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 150 塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 1 6

CCTAGTGGAT GCCCAGTAGA TCAGCAGTTT AGGTGCTTTC CCTGGTTCT GGTGGTACCA

60

GCCCAAGTAG TTCTTGTGAT TTGCACTGTA TAAAACACTT TGACTGGACT TACAGCTCAT

120

AGTGACCCTA TCTCCAACAG ATGCGCTCAG

150

(2) 配列番号 : 1 7

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 52 塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 1 7

GACAAGCTTC AGCTGACCCA GTCTCCATCA TCTCTGAGCG CATCTGTTGG AG

52

(2) 配列番号 : 1 8

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 45 塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 1 8

AGAGAATCGC GAAGGGACAC CAGATTCCCT AGTGGATGCC CAGTA

45

(2) 配列番号： 1 9

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 121 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 1 9

GCACCTTGGT CCCTCCACCG AACGTCCACG AGGAGAGGTA TTGGTGACAA TAATATGTTG

60

CAATGTCTTC TGGTTGAAGA GAGCTGATGG TGAAAGTAAA ATCTGTCCCA GATCCGCTGC

120

C

121

(2) 配列番号： 2 0

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 40 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 2 0

GACAAGCTTT CGCGATTCTC TGGCAGCGGA TCTGGGACAG

40

(2) 配列番号： 2 1

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 33 塩基対
- (B) 配列の型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(xi) 配列： 配列番号 2 1

GACCGGGAGA TCTGCACCTT GGTCCCTCCA CCG

33

FIG. 1A

マヌキン
Murine
RETHUVK

FR1	L1	FR2	L2	FR3	L3	FR4
DIOLOPSSSLAVSAGENVTMSC	KSSSQSVLYSAMHKNVLA	WYQQKPGQSP	* WASMRES	* KLLTX	HOXTLS	GEGETKLEI KAR
---SA-V-DR-	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---

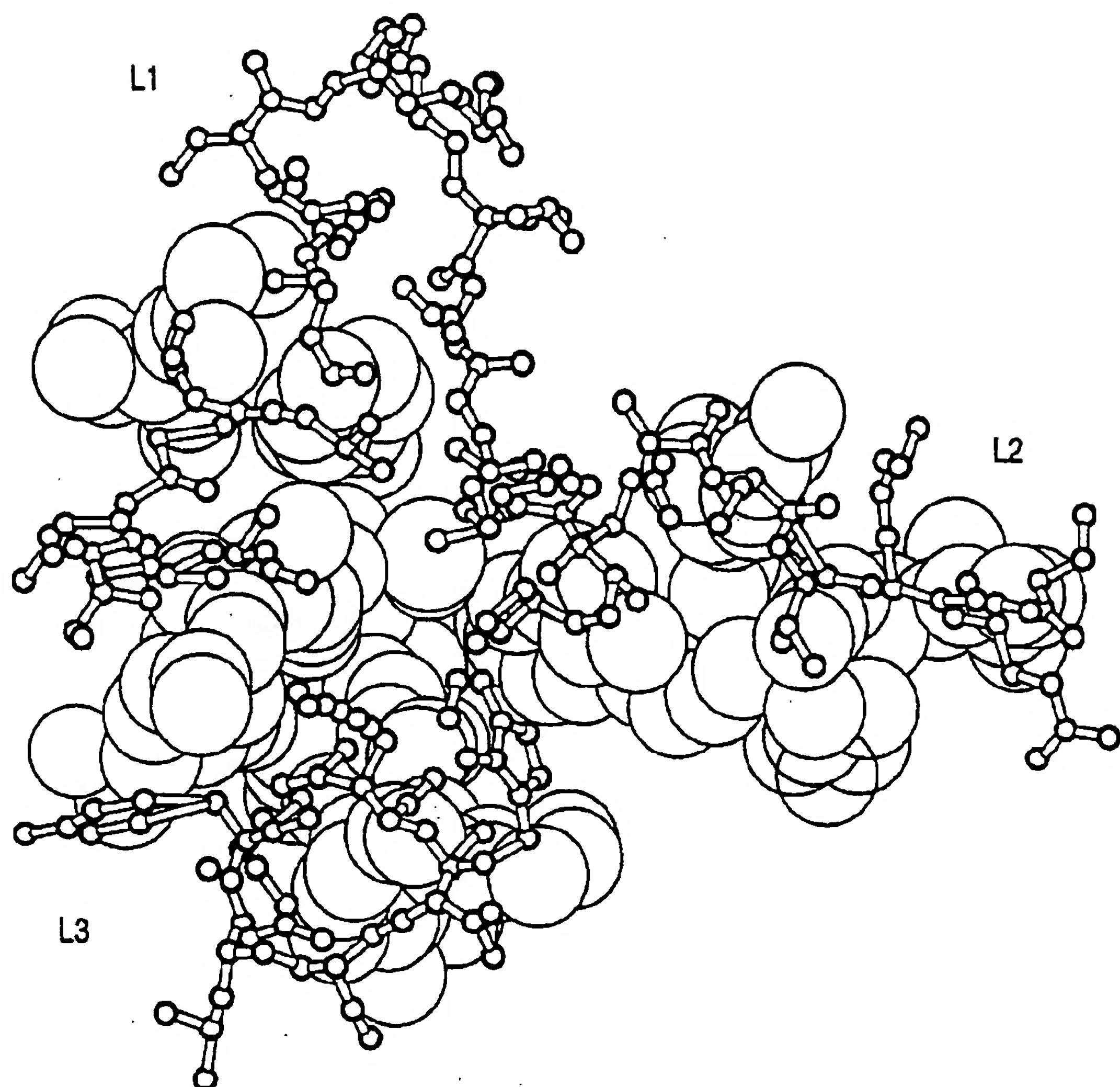
FIG. 1B

EUHUVH2
EUHUVH1
MURINE
Z

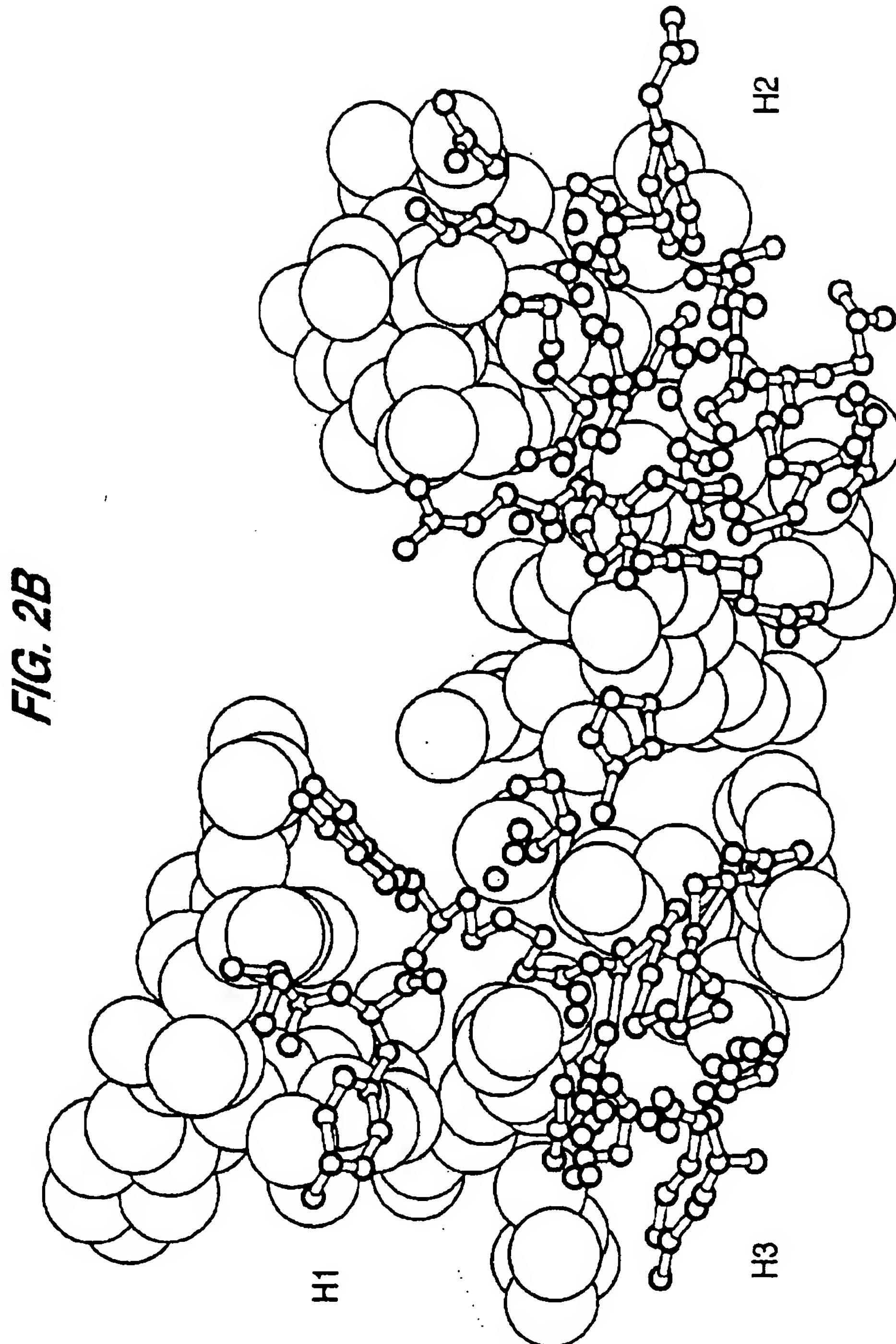
H1	FR1	FR2	*
<u>QVQLQESGAELSKPKGASVKMSCKASGYTPE</u>	<u>SYWLH</u>	<u>WIKQRPGQQGLKKTIG</u>	
- - - - Q - - - V K - - - S - - - V - - - - -	- - - -	- VR - A - - - - -	
- - - - V Q - - - V K - - - S - - - V - - - - -	- - - -	- VR - A - - - - -	
H2		FR3	*
<u>YINPRNDYTYEYNQNMFKD</u>	<u>KATILTADKSSTAXMQLSSLT</u>	<u>SEDSAVYYCAR</u>	
- - - - I - - - E - TN - - - - -	- - - - R - - - - T - F - P - - -		
- - - - I - - - E - TN - - - - -	- - - - R - - - - T - F - P - - -		
H3		FR4	
<u>RDTITTEY</u>	<u>WGQGTTLTVYSS</u>		
- - - - -	- - - - V - - -		

【図2】

FIG. 2A



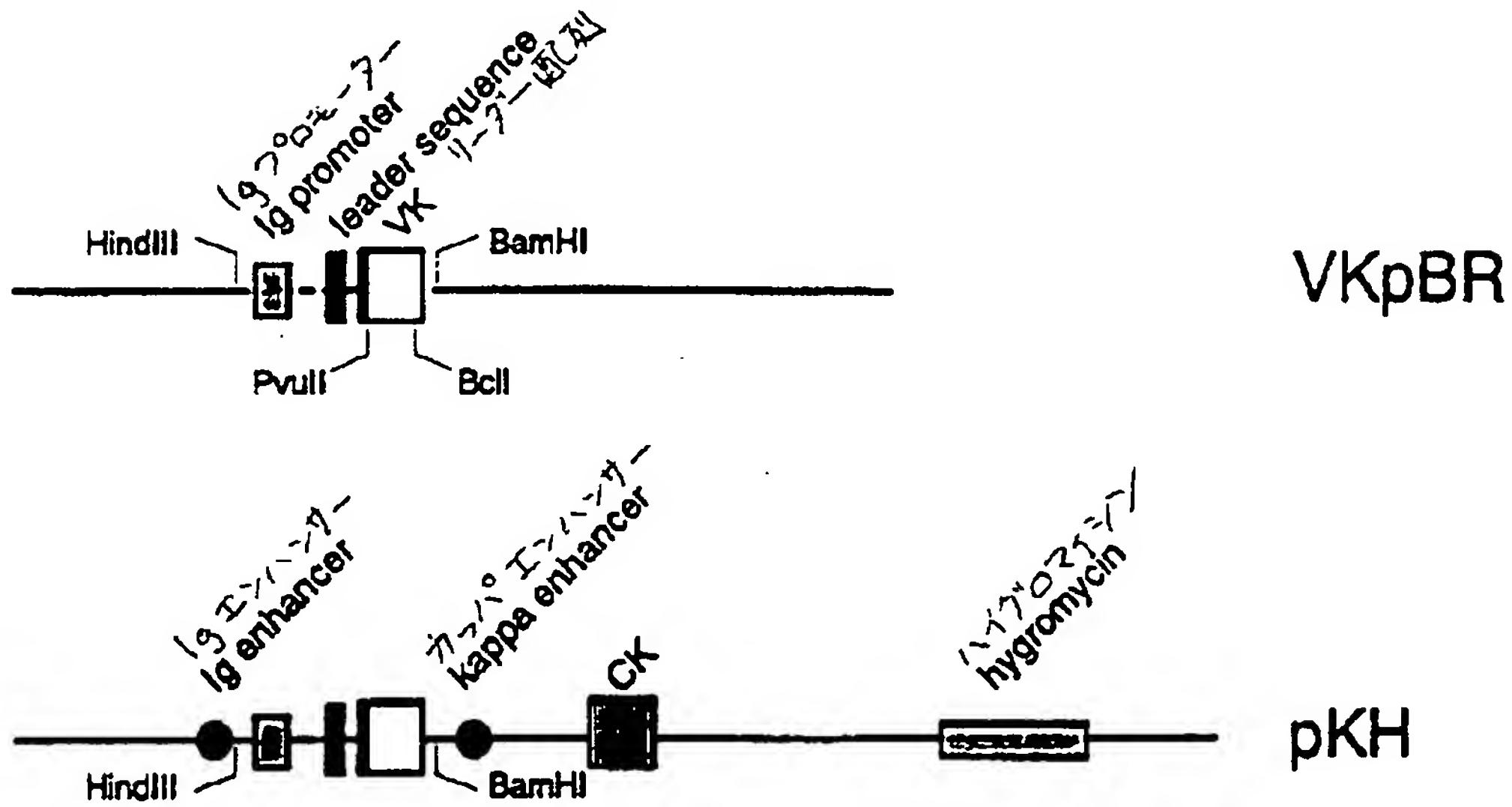
【図2】



【図3】

FIG. 3

A. 軽鎖ステーシングおよび発現ベクター A. Light Chain Staging and Expression Vector



B. 重鎖ステーシングおよび発現ベクター B. Heavy Chain Staging and Expression Vector

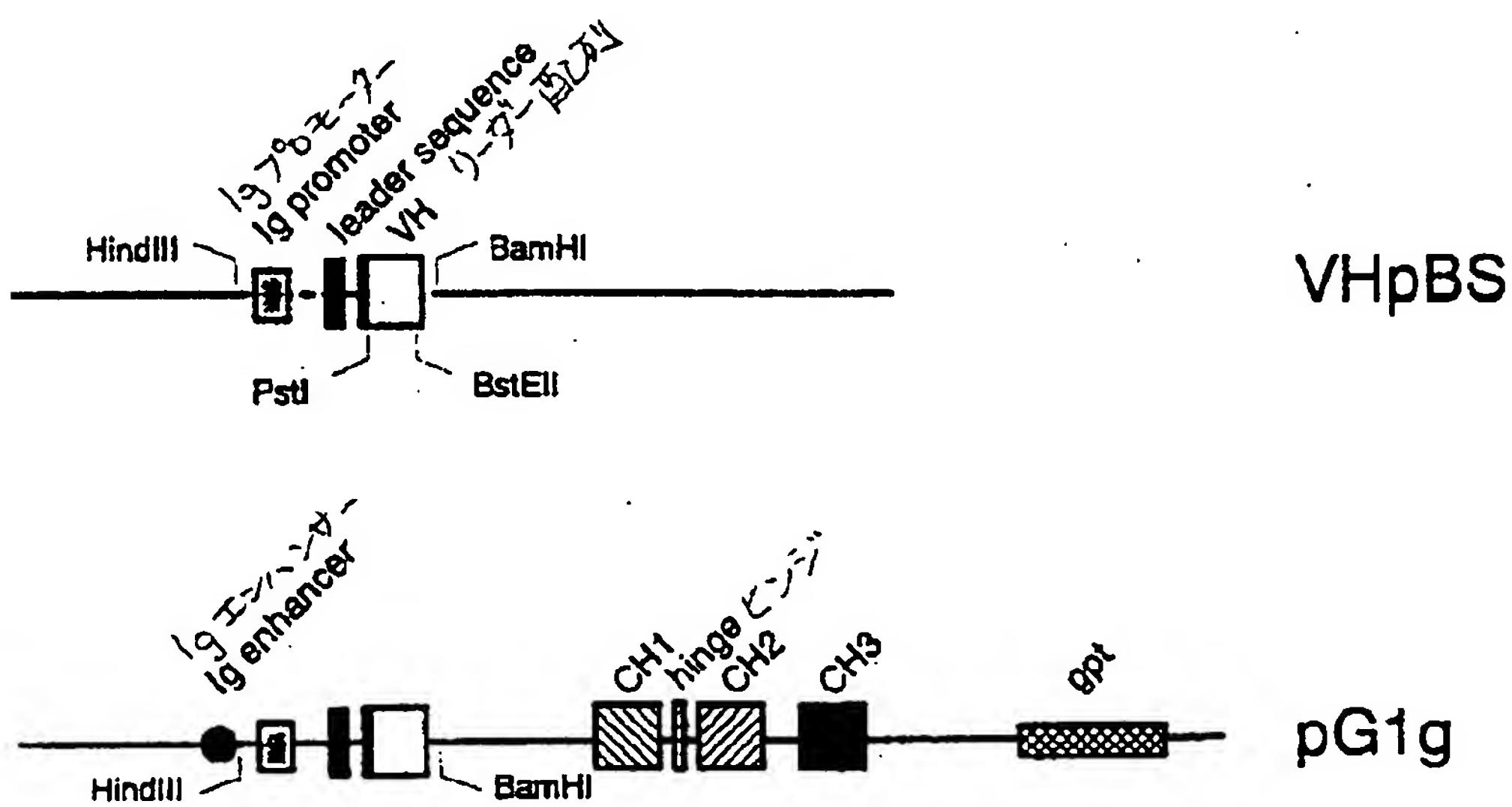


FIG. 4A

LL2 VK

GACATTCAAGCTGACCCAGTCCTCCATCATCTCTGGCTGTCTGCAGGAGAAAACGTCACT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CTGTAAGTCGACTGGGTCAAGAGGTAGTAGAGACCGACACAGACGTCCCTTTGCAGTGA
 D I Q L T Q S P S S L A V S A G E H Y T -
 ATGAGCTGTAAGTCAGTCAGTCAGTGTCTACAGTGCAAAATCACAGAACTACTTGGCC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TACTCGACATTCAAGGTCAAGTTCAACAAATATGTACGTTAGTGTCTTGATGAACCGG
 CDR1
 M S C [K S S Q S V L Y S A N H K N Y L A] -
 TGGTACCAAGCAGAAACCAGGGCAGTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGATCCACTAGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 ACCATGGTCGTCTTGGTCCCCTCAGAGGATTTGACGACTAGATGACCCGTAGGTGATCC
 CDR2
 W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y [W A S T R] -
 GAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGCGGATCTGGGACAGATTTACTCTTACC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CTTAGACCACAGGGACTACCGAAGTGTCCGTCGCCTAGACCCGTCTAAATGAGAATGG
 [E S] G V P D R F T G S G S G T D F T L T -
 ATCAGCAGAGTACAAGTTGAAGACCTGGCAATTATTATTGTCACCAATAACCTCTCTCG
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TAGTCGTCTCATGTTCAACTCTGGACCGTAAATAAAACAGTGGTTATGGAGAGGAGC
 CDR3
 I S R V Q V E D L A I Y Y C [H Q Y L S S] -
 TGGACGPTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGAGTCAAACGT
 301 -----+-----+-----+-----+ 339
 ACCTGCAAGCCACCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTGCA
 [W T P] G G G T K L E I K R -

FIG. 4B
LL2 VH

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGGCTGAACGTCAAAACCTGGGGCTCAGTGAAGATG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 GTCCAGGTGCACGTCCCTCAGTCCCCACTTGACAGTTGGACCCCGAGTCACTTCTAC
 Q V Q L Q E S G A E L S K P G A S V K M -
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGATAAAACAGAGG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 AGGACGTTCCGAAGACCGATGTGGAAATGATCGATGACCGACGTGACCTATTTGTCTCC
 CDR1
 S C K A S G Y T F T [S Y W L H] W I K Q R -
 CCTGGACAGGGCTGGAAATGGATTGGATACTTAATCCTAGGAATGATTATACTGAGTAC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GGACCTGTCCCAGACCTTACCTAACCTATGTAATTAGGATCCTACTAATATGACTCATG
 CDR2
 P G Q G L E W I G [Y I N P R N D Y T E Y] -
 AATCAGAACTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTAGTCTTGAAGTTCTGTCCGGTGTAACTGACGTCTGTTAGGAGGTGGTGTCCGATG
 [N Q N F K D] K A T L T A D K S S S T A Y -
 ATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAGGGAT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TACGTTGACTCGTCGGACTGTAGACTCCTGAGACGTAGATAATGACACGTTCTCCCTA
 M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R [R D] -
 ATTACTACGTTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCCTCG
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 348
 TAATGATGCAAGATGACCCCGGTTCCGTGGTGAAGAGTGTAGAGGAGC
 CDR3
 [I T T F Y] W G Q G T T L T V S S -

【図5】

FIG. 5A

GACATTCTGACCCAGTCTCCATCATCTGAGCGCATCTGGAGATAGGGTC
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CTGTAAGTCGACTGGGTCAAGAGGTAGTAGAGACTCGCGTAGACAACTCTATCCCAGTGA
 D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T -

 ATGAGCTGTAAAGTCCAGTCAAAGTGTAACTACAGTGCATAATCACAAGAACTACTGGCC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TACTCGACATTCAAGGTCAAGTTCACAAAATATGTCACGTTAGTGTCTTCATGAACCCG
 CDR1
 M S C K S S Q S V L Y S A N H K N Y L A -

 TGGTACCAAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 ACCATGGTCGTCTTGGTCCCTTCGTGGATTGACGACTAGATGACCCGTAGGTGATCC
 CDR2
 W Y Q Q R P G K A P K L L I Y W A S T R -

 GAATCTGGTCCCTTCGCGATTCTCTGGCAGCGGATCTGGGACAGATTACTTCACC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CTTAGACCACAGGGAAAGCGCTAAGAGACCGTCGCCCTAGACCCGTCTAAAATGAAAGTGG

 E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T -

 ATCAGCTCTTCAACCAAGAACATTGCAACATATTATTGTACCAATACCTCTCCTCG
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TAGTCGAGAGAAGTTGGTCTCTGTAACTGTATAACAGTGTTATGGAGAGGGAGC
 CDR3
 I S S L Q P E D I A T Y Y C E Q Y L S S -

 TGGACGTTGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 339
 ACCTGCAAGCCACCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTGCA

 W T F G G G T K L E I K R

FIG. 5B

CAGGTCCAGCTGGTCCAATCAGGGCTGAAGTCAAGAACCTGGTCATCAGTGAAGGTC
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 GTCCAGGTGACCGAGGTTAGTCCCCGACTTCAGTTCTTGGACCCAGTAGTCACCCAG
 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V -

TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTACTAGCTACTGGCTGCAGGGTCAGGCAGGCA
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 AGGACGTTCCCAAGACCGATGTGGAAATGATCGATGACCGACGTGACCCAGTCCGTCCGT
 CDR1
 S C K A S G Y T F T S Y W L H W V R Q A -

CCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACTTAATCCTAGGAATGATTACTGAGTAC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GGACCTGTCCCAGACCTTACCTAACCTATGTAATTAGGATCCTACTAATATGACTCATG
 CDR2
 P G Q G L E W I G Y I N P R N D Y T E Y -

AATCAGAACTTCAAGGACAAGGCCACAATAACTGCAGACGAATCCACCAATAACGCCAAC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTAGTCTTGAAGTTCTGTTCCGGTGTATTGACGTCTGCTTAGGTGGTTATGTCGGATG
 CDR3
 N Q N F K D X A T I T A D E S T N T A Y -
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACGGCATTATTTGTGCAAGAACGGAT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TACCTCGACTCGTCGGACTCCAGACTCCTGTGCCGAAAAACACGTTCTCCCTA
 M E L S S L R S E D T A F Y F C A R R D -
 ATTACTACGTTCTACTGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCG
 301 -----+-----+-----+-----+-----+ 348
 TAATGATGCAAGATGACCCGGTCCGTGGTGCCAGTGGCAGAGGAGC
 CDR3
 I T T F Y W G Q G T T V T V S S -

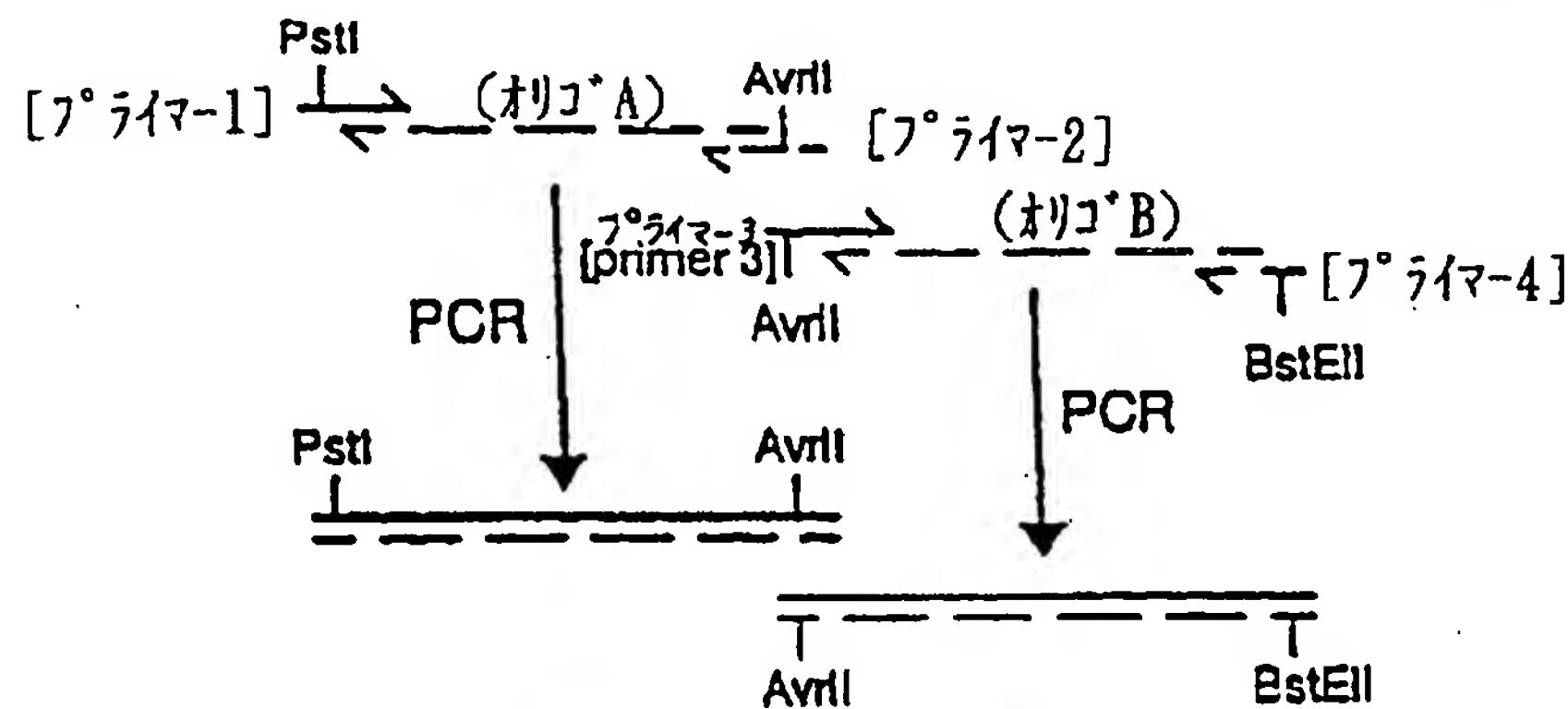
【図6】

FIG. 6

ヒト化LL2 VH領域のためにデザインされた配列



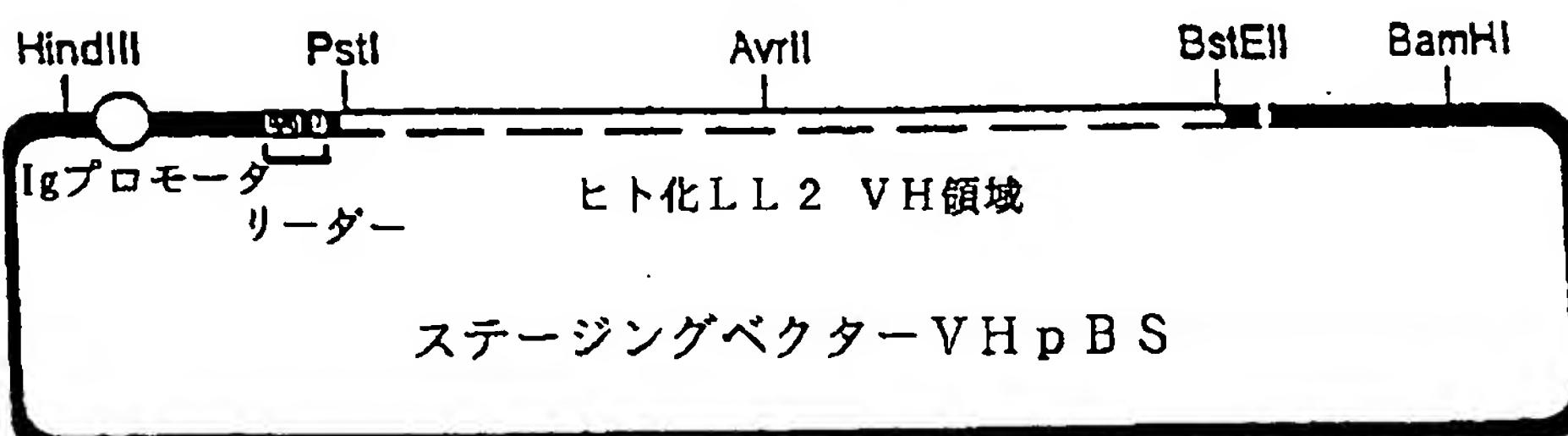
長いオリゴヌクレオチドとPCRによるヒト化LL2 VH領域の構築



PstI/AvrII 消化

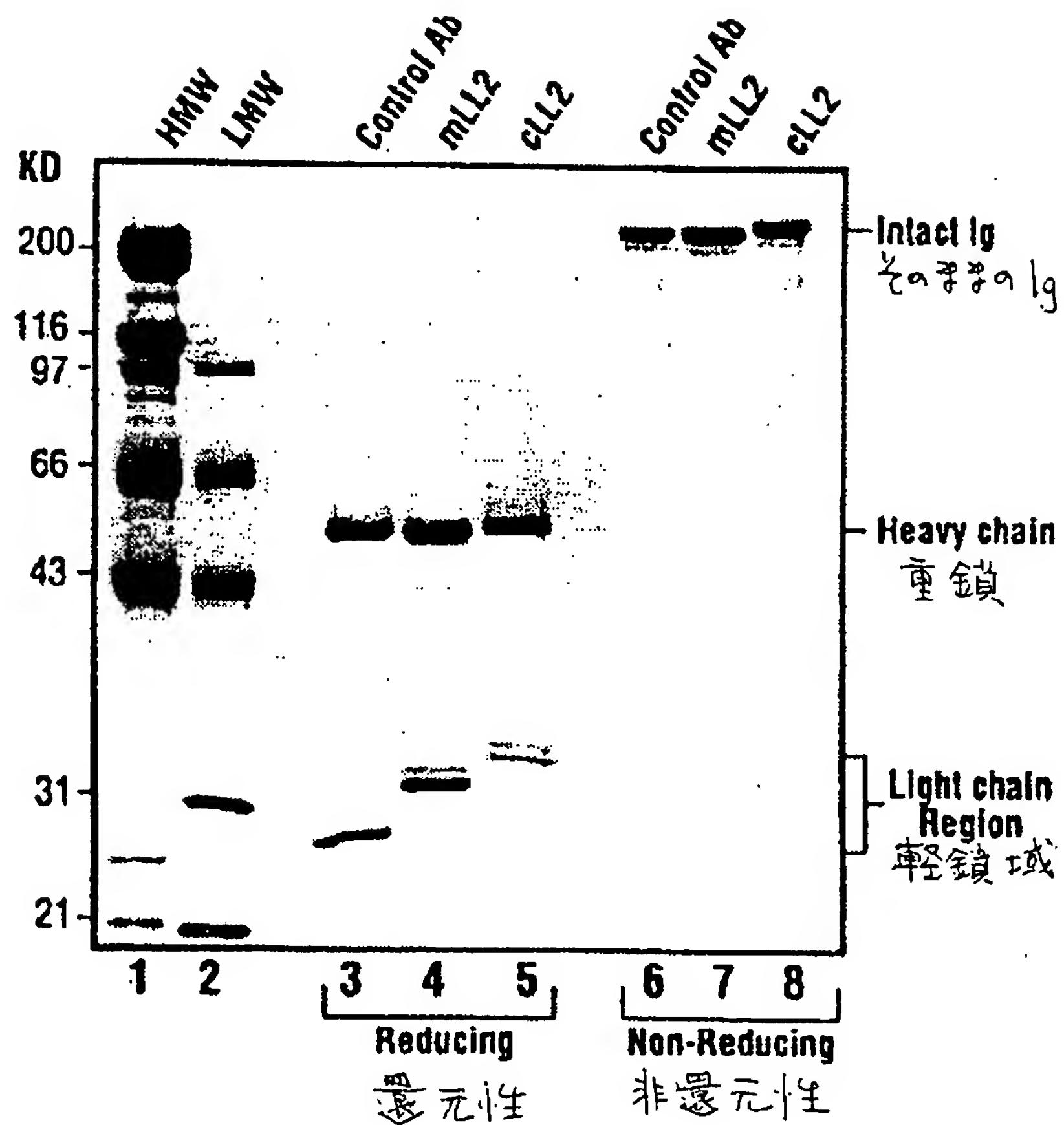
BstEII/AvrII 消化

重鎖ステージングベクタ
—VH_pBSのPstI/BstEII部
位への結合



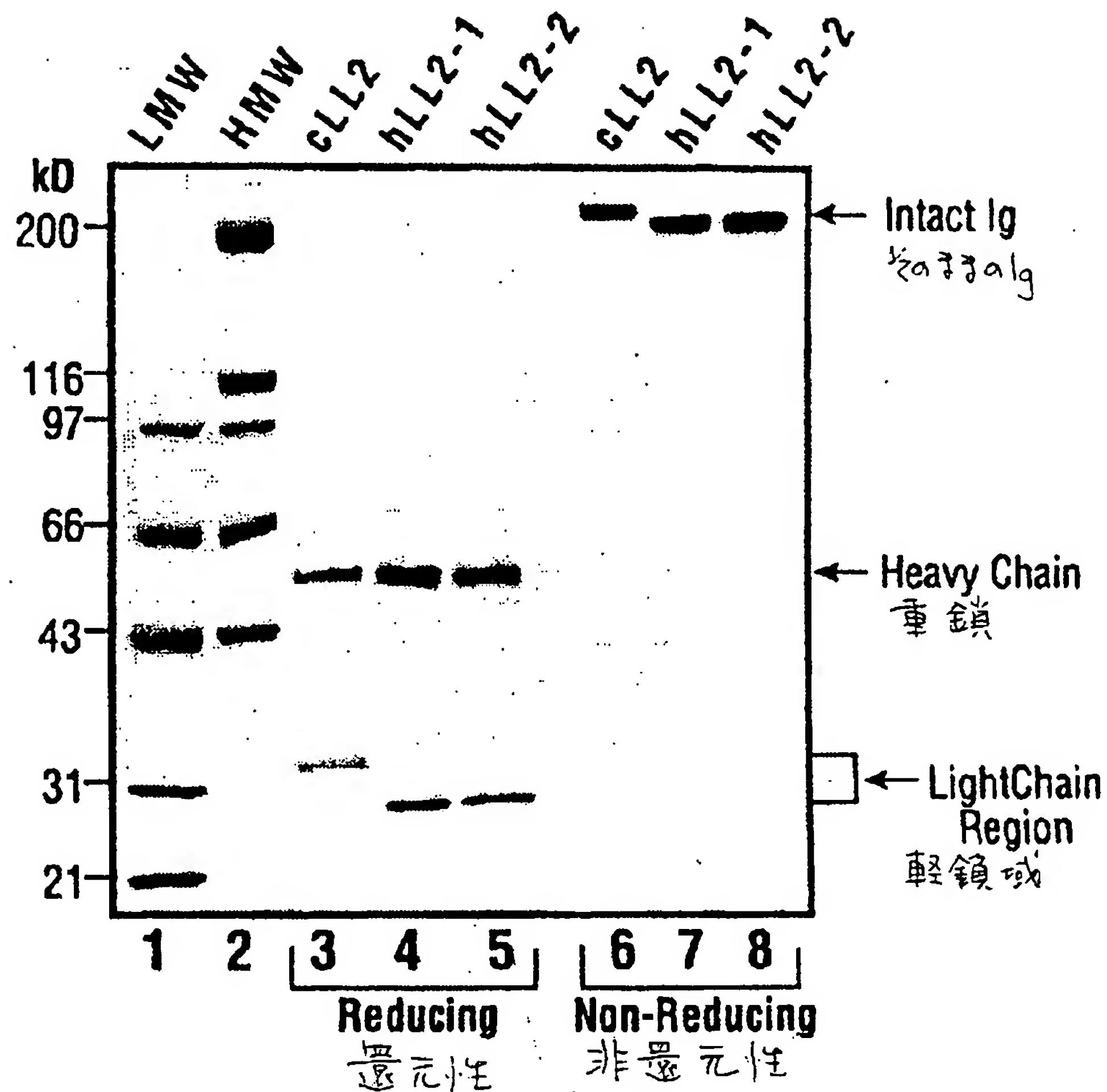
【図 7】

FIG. 7



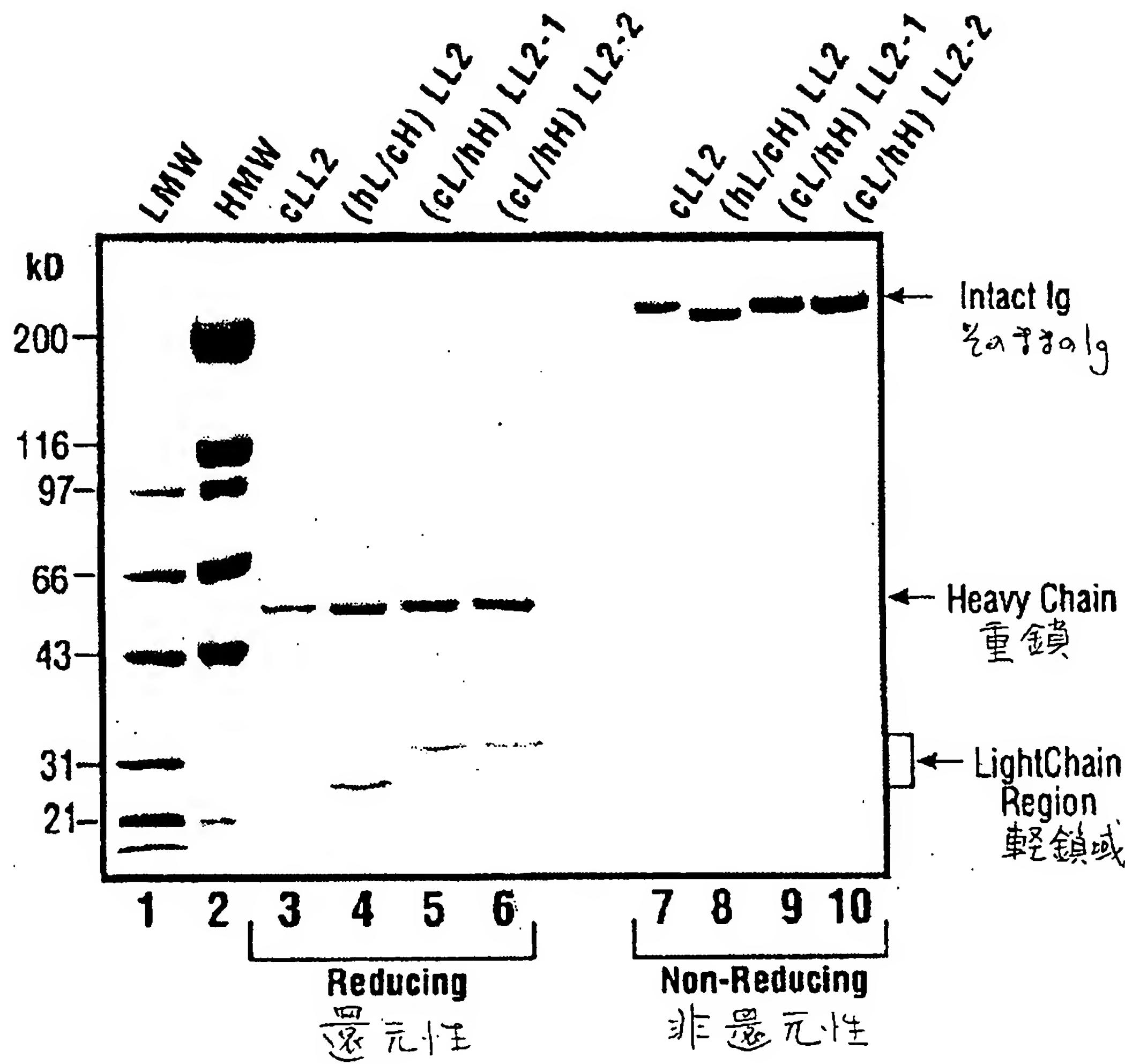
【図8】

FIG. 8

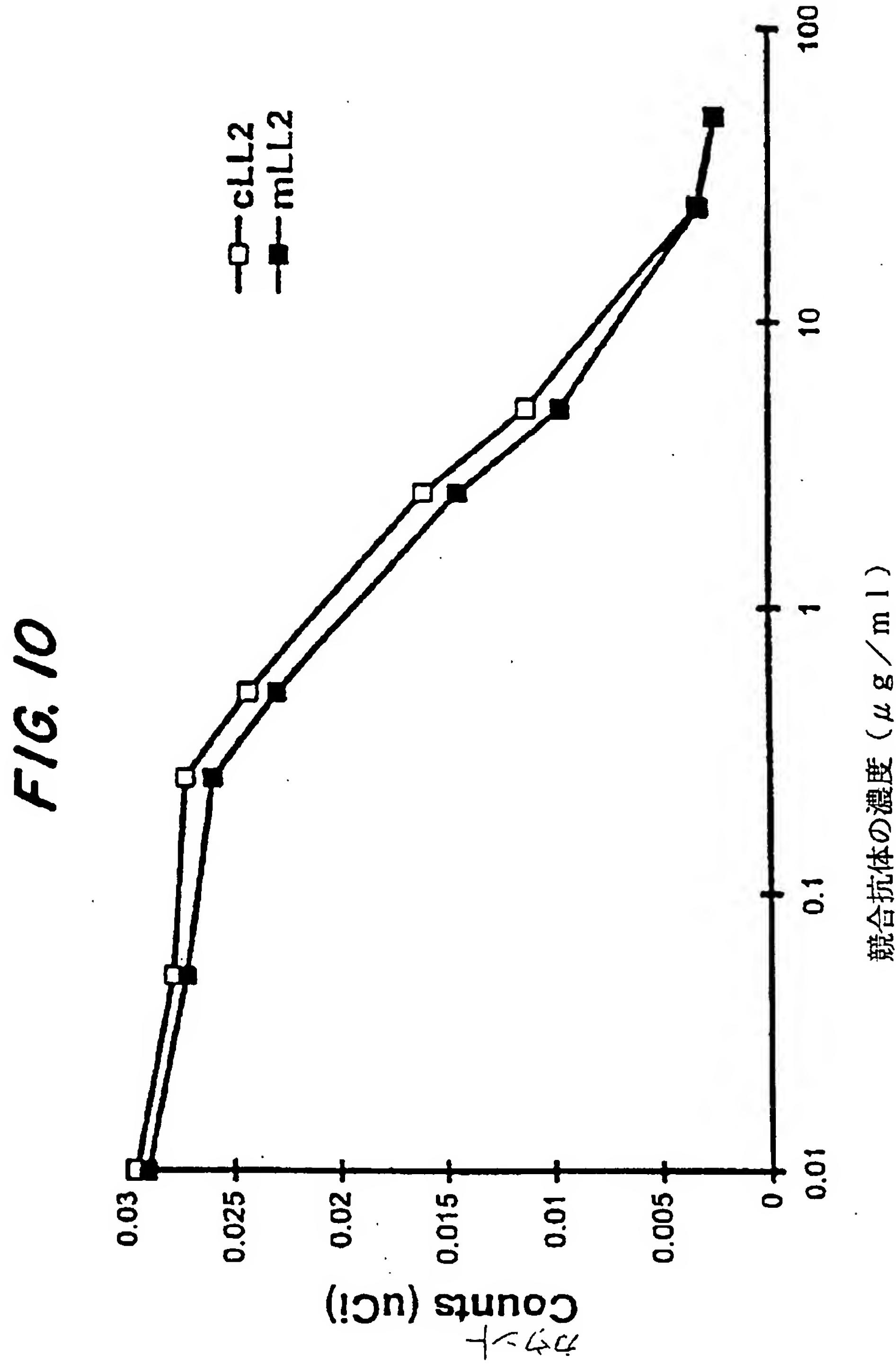


【図9】

FIG. 9

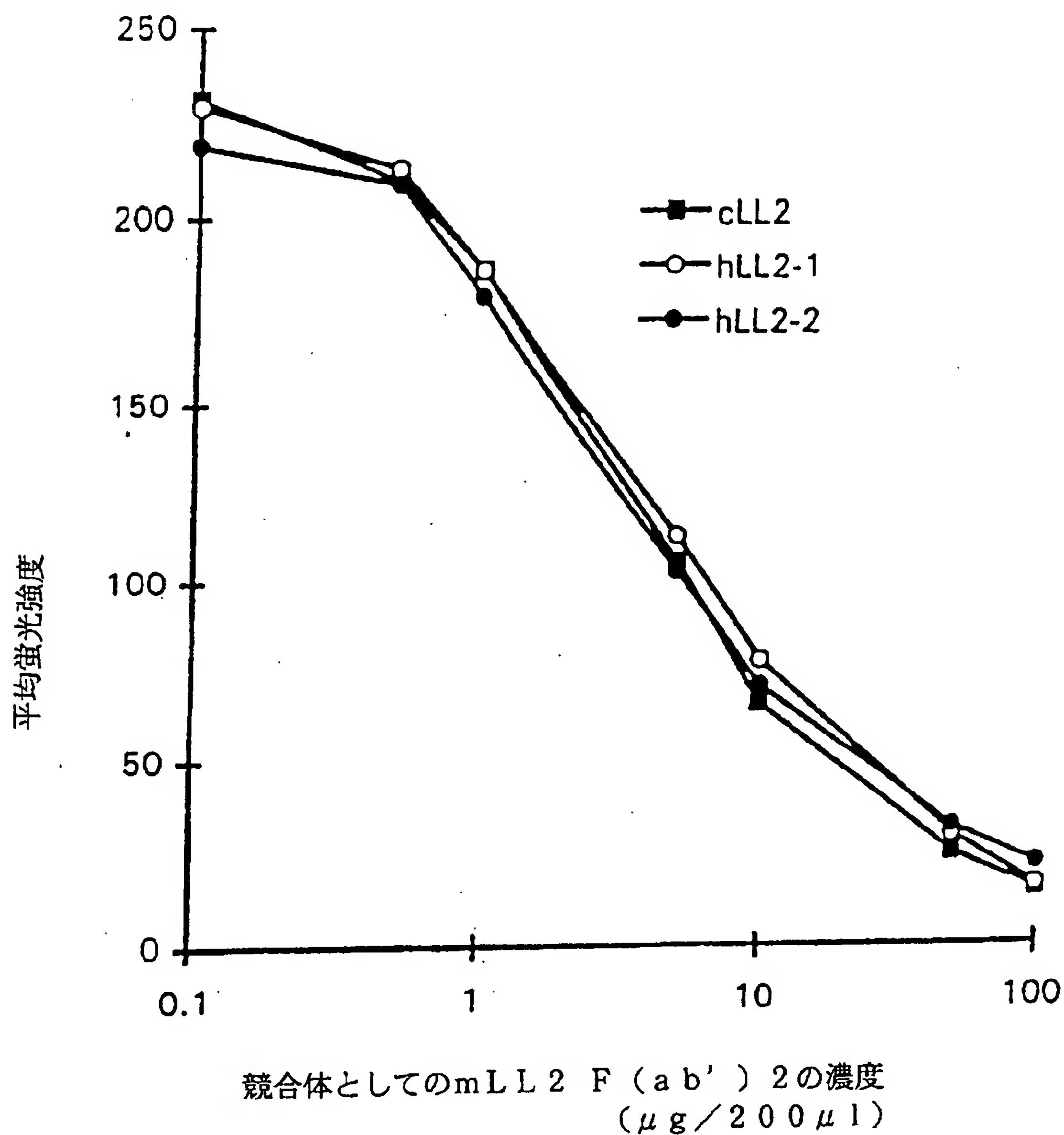


【図 10】



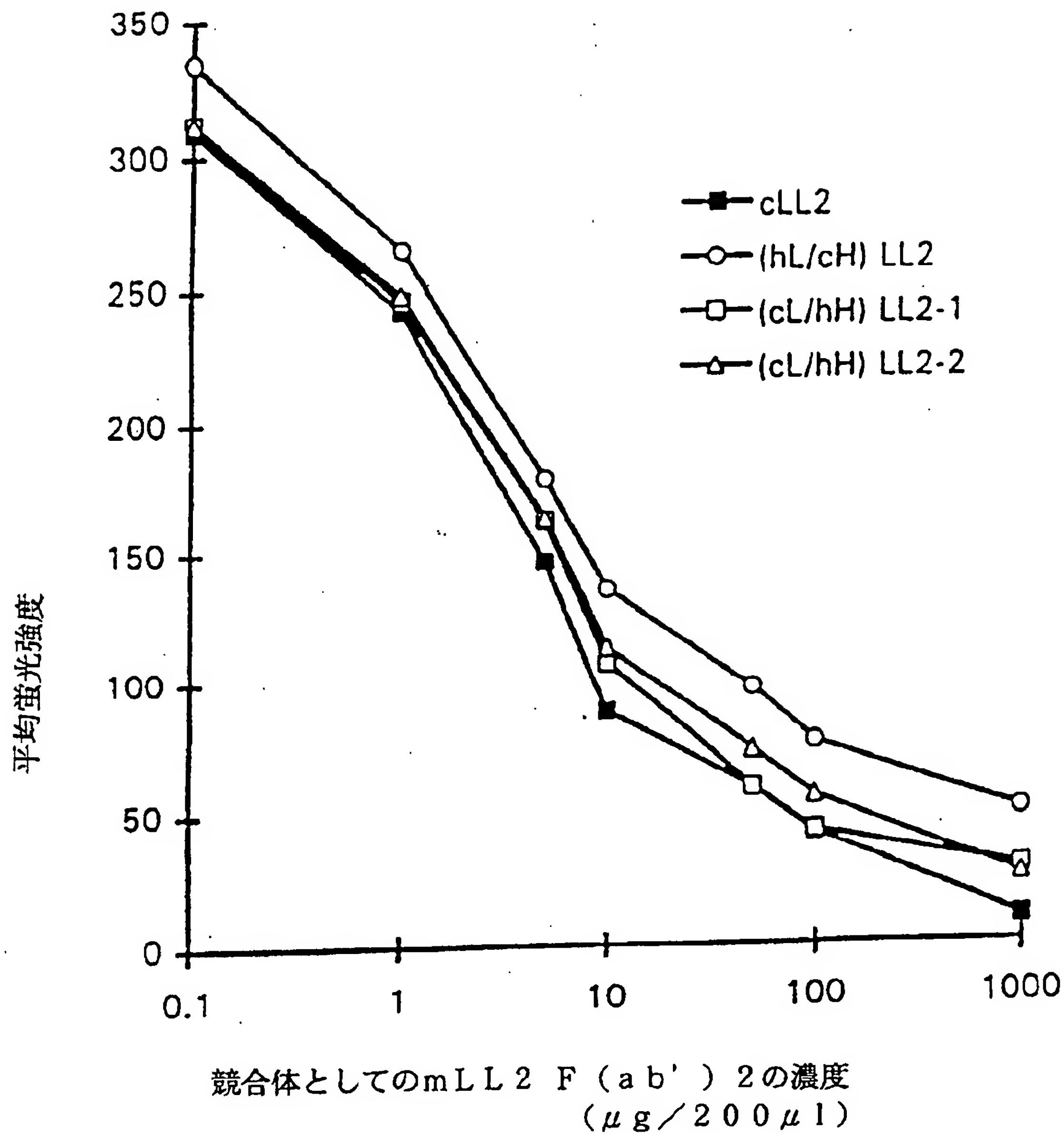
【図11】

FIG. II A



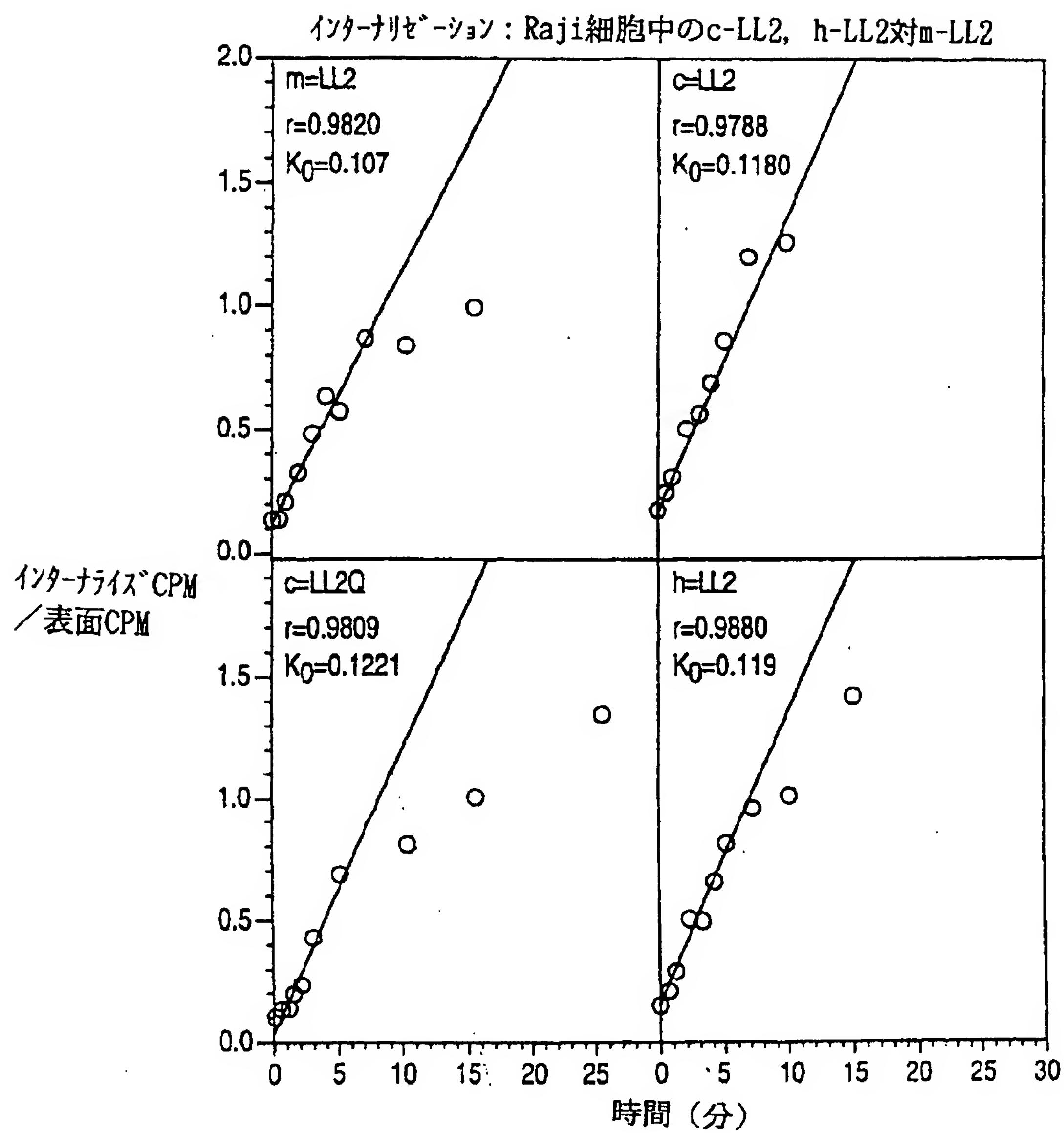
【図11】

FIG. II B



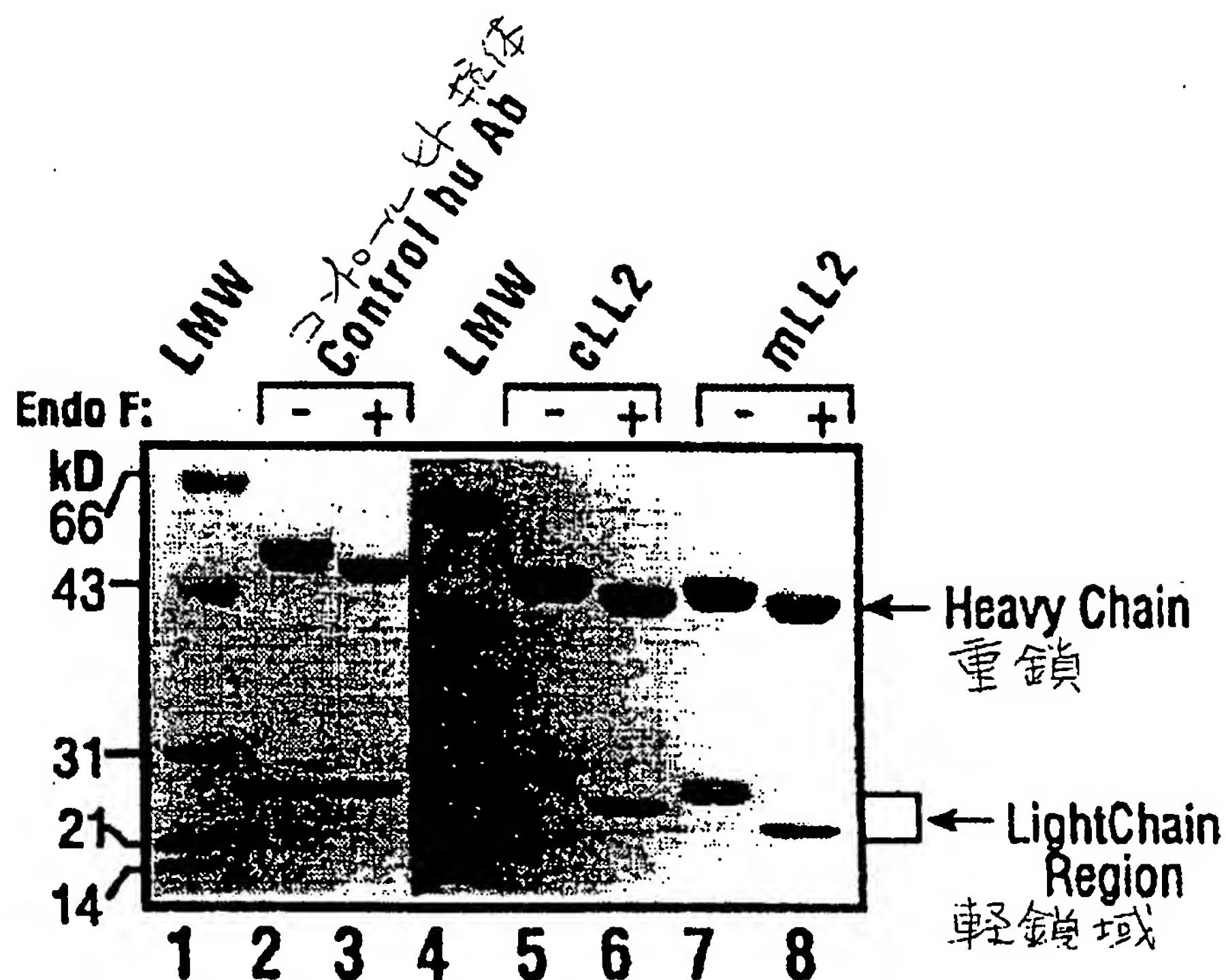
【図12】

FIG. 12



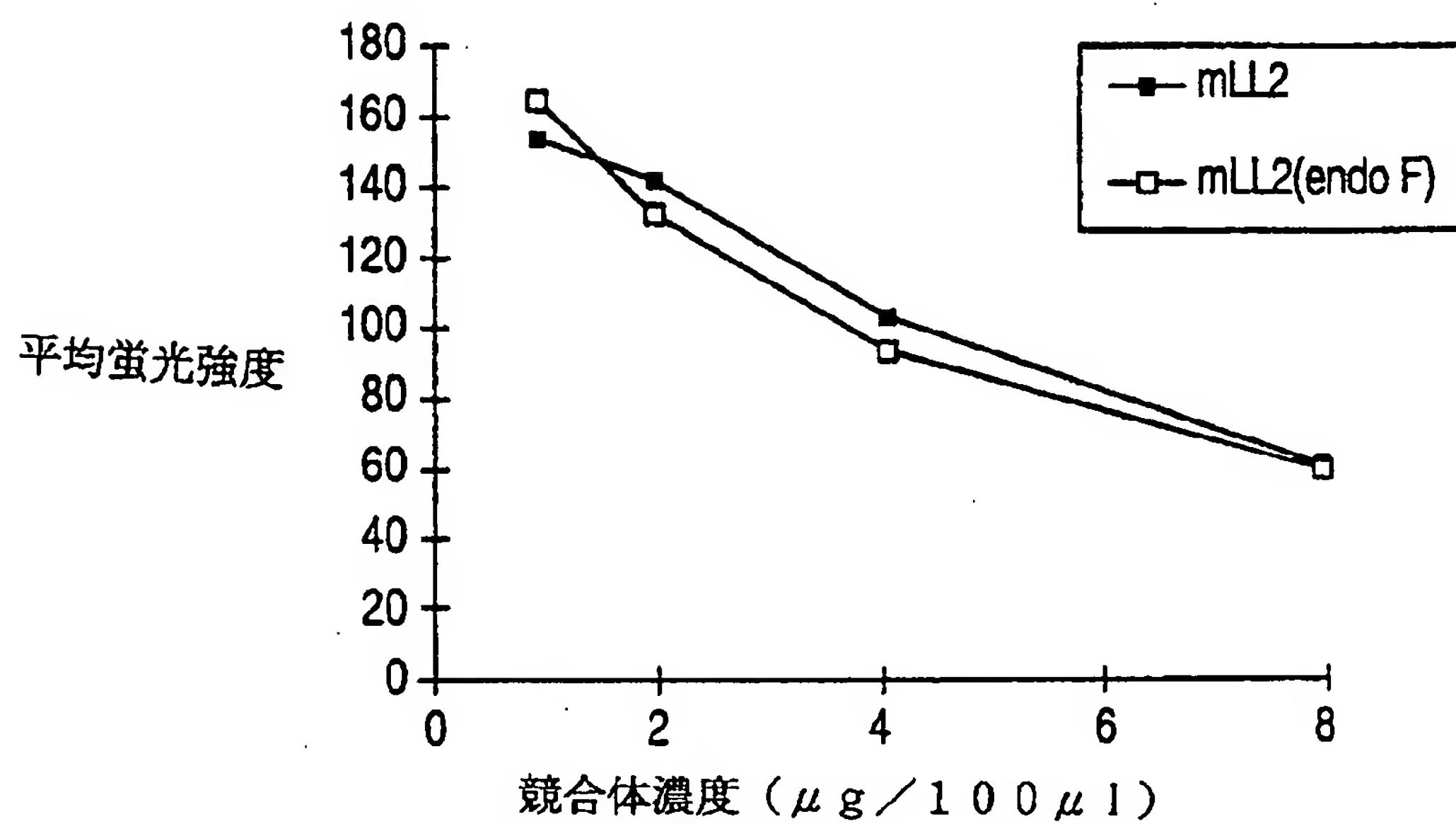
【図13】

FIG. 13



【図14】

FIG. 14



【手続補正書】

【提出日】 1997年6月6日

【補正内容】

記

実施態様例

以下は、本願発明の実施態様例である。

1. 親mLL2抗体のB細胞リンパ腫細胞と白血病細胞ターゲティング特性及び細胞インターナリゼーション特性を実質的に保持しているように、ヒトκ定常領域及びIgG₁定常領域にそれぞれ連結されたヒトVK及びヒトVH領域のフレームワーク配列とそれぞれ結合したmLL2モノクローナル抗体の軽鎖と重鎖の相補性決定領域（「CDR」）を含むhLL2モノクローナル抗体であって、

KSSQSVLYSANHKNYLA

のアミノ酸配列（配列番号2の24～40番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVK領域の単離された相補性決定領域1（CDR1）のポリペプチドと、

WASTRES

のアミノ酸配列（配列番号2の56～62番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVK領域の単離されたCDR2のポリペプチドと、

HQYLSSWTF

のアミノ酸配列（配列番号2の95～103番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVK領域の単離されたCDR3のポリペプチドと、

SYWLH

のアミノ酸配列（配列番号4の31～35番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVH領域の単離されたCDR1のポリペプチドと、

YINPRNDYTEYNQNFKD

のアミノ酸配列（配列番号4の50～66番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVH領域の単離されたCDR2のポリペプチドと、

RDITTFY

のアミノ酸配列（配列番号4の99～105番目の残基）を含む、LL2モノク

ローナル抗体のVH領域の単離されたCDR3のポリペプチドとを含む前記モノクローナル抗体。

2. バリンが前記重鎖の5番目のアミノ酸の位置に挿入されている実施態様例1に記載のhLL2モノクローナル抗体

3. グルタミンが前記重鎖の5番目のアミノ酸の位置に挿入されている実施態様例1に記載のhLL2のモノクローナル抗体。

4. ヒトκ定常領域及びIgG₁定常領域とそれぞれ結合したmLL2モノクローナル抗体の軽鎖と重鎖の可変領域を含むcLL2モノクローナル抗体。

5. 実施態様例1に記載のhLL2モノクローナル抗体、又は、B細胞リンパ腫細胞及び白血病細胞と結合するその特異的結合断片を含む、B細胞リンパ腫細胞及び白血病細胞ターゲティング結合体であって、前記hLL2モノクローナル抗体は診断用又は治療用試薬と共有結合している前記結合体。

6. 実施態様例4に記載のcLL2モノクローナル抗体、又は、B細胞リンパ腫細胞及び白血病細胞と結合するその特異的結合断片を含むB細胞リンパ腫細胞及び白血病細胞ターゲティング結合体であって、前記cLL2モノクローナル抗体は診断用又は治療用試薬と共有結合している前記結合体。

7. 前記診断用試薬が標識を含む実施態様例5又は6に記載の結合体。

8. 前記治療用試薬が細胞傷害性剤を含む実施態様例5又は6に記載の結合体

。

9. 前記治療用試薬は、前記モノクローナル抗体又はその特異的細胞結合断片の炭水化物部分によって、前記モノクローナル抗体又はその特異的細胞結合断片と結合している実施態様例5又は6に記載の結合体。

10. LL2モノクローナル抗体の軽鎖可変(VK)領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、かつ、LL2pKhと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている図4A(配列番号1)に記載の単離されたポリヌクレオチド。

11. hLL2のVKドメインのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、かつ、hLL2pKhと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている図5A(配列番号5)に記載の単離されたポリヌクレオチド。

12. Igプロモーター、シグナルペプチドDNA配列、ヒトκ定常領域のゲノム配列、Igエンハンサー、κエンハンサー、及び、マーカー遺伝子を前記ベクターが適宜含む実施態様例10又は11に記載のポリヌクレオチド。

13. LL2モノクローナル抗体の重鎖可変（VH）領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、かつ、hLL2pG1gと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている図4B（配列番号3）に記載の単離されたポリヌクレオチド。

14. hLL2のVHドメインのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、かつ、hLL2pK1gと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている図5B（配列番号7）に記載の単離されたポリヌクレオチド。

15. 前記ベクターが、Igプロモーター、シグナルペプチドDNA配列、ヒトIgG₁定常領域のゲノム配列、Igエンハンサー、及び、マーカー遺伝子のうち一以上をさらに含む実施態様例13又は14に記載のポリヌクレオチド。

請求の範囲

1. 親mLL2抗体のB細胞リンパ腫細胞と白血病細胞ターゲティング特性及び細胞インターナリゼーション特性を実質的に保持しているように、ヒトκ定常領域及びIgG₁定常領域にそれぞれ連結されたヒトVK及びヒトVH領域のフレームワーク配列とそれぞれ結合したmLL2モノクローナル抗体の軽鎖と重鎖の相補性決定領域（「CDR」）を含むhLL2モノクローナル抗体であって、

KSSQSVLYSANHKNYLA

のアミノ酸配列（配列番号2の24～40番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVK領域の単離された相補性決定領域1（CDR1）のポリペプチドと、

WASTRES

のアミノ酸配列（配列番号2の56～62番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVK領域の単離されたCDR2のポリペプチドと、

HQYLSSWTF

のアミノ酸配列（配列番号2の95～103番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVK領域の単離されたCDR3のポリペプチドと、

SYWLH

のアミノ酸配列（配列番号4の31～35番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVH領域の単離されたCDR1のポリペプチドと、

YINPRNDYTEYNQNFKD

のアミノ酸配列（配列番号4の50～66番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVH領域の単離されたCDR2のポリペプチドと、

RDITTFY

のアミノ酸配列（配列番号4の99～105番目の残基）を含む、LL2モノクローナル抗体のVH領域の単離されたCDR3のポリペプチドとを含む前記モノクローナル抗体。

2. ヒト κ 定常領域及びIgG₁定常領域とそれぞれ結合しているmLL2モノクローナル抗体の軽鎖と重鎖の可変領域を含むcLL2モノクローナル抗体。

3. LL2モノクローナル抗体の軽鎖可変（VK）領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、かつ、LL2pKhと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている配列番号1に記載の単離されたポリヌクレオチドと、

hLL2のVKドメインのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、かつ、hLL2pKhと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている配列番号5の単離されたポリヌクレオチドと、

LL2モノクローナル抗体の重鎖可変（VH）領域のアミノ酸配列をコードするDNAを含み、かつ、hLL2pG1gと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている配列番号3の単離されたポリヌクレオチドと、

hLL2のVHドメインのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含み、hLL2pK1gと名付けられた哺乳類の発現ベクターに組み込まれている配列番号7の単離されたポリヌクレオチドと

から成る群から選択される1以上のベクターであって、

さらに、Igプロモーター、シグナルペプチドDNA配列、ヒトIgG₁定常

領域のゲノム配列、Igエンハンサー、マーカー遺伝子のうちの1以上を適宜含む前記ベクター。

4. 請求項1に記載のhLL2モノクローナル抗体若しくは請求項2に記載のcLL2モノクローナル抗体、又は、B細胞リンパ腫細胞又は白血病細胞と結合する前記抗体の特異的結合断片を含むB細胞リンパ腫細胞及び白血病細胞ターゲティング化合物であって、前記hLL2若しくはcLL2モノクローナル抗体、又は、その断片は、診断用又は治療用試薬と共有結合している前記化合物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/09641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : A61K 35/16, 39/00, 39/395; C07K 16/00, 16/46; C12N 15/09, 15/13
US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/91; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.73, 388.8, 391.1, 391.3, 391.5; 536/23.53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, MEDLINE, SEQUENCE DATABASE

SEARCH TERMS: LL2, CD22, ANTIBODY, INVENTORS, SEQUENCES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NATURE, VOLUME 332, ISSUED 24 MARCH 1988, RIECHMANN ET AL. "RESHAPING HUMAN ANTIBODIES FOR THERAPY" PAGES 323-327, SEE ENTIRE REFERENCE.	1-25
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, VOLUME 86, ISSUED DECEMBER 1989, QUEEN ET AL. "A HUMANIZED ANTIBODY THAT BINDS TO THE INTERLEUKIN 2 RECEPTOR" PAGES 10029-10033, SEE ENTIRE REFERENCE.	1-25
Y	CANCER, VOLUME 73, ISSUED 01 FEBURARY 1994, BAUM ET AL. "INITIAL CLINICAL RESULTS WITH TECHNETIUM- 99M-LABELED LL2 MONOCLONAL ANTIBODY FRAGMENT IN THE RADIOIMMUNODETECTION OF B-CELL LYMPHOMAS" PAGES 896-899, SEE ENTIRE REFERENCE.	1-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'A'		document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
'E'		earlier document published on or after the international filing date
'L'		document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
'O'		document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
'P'		document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"X"		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"		document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 SEPTEMBER 1995

Date of mailing of the international search report

19 OCT 1995

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Faxsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
DONALD E. ADAMS, PH.D.

Telephone No. (703) 305-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US95/09641

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,057,313 (SHIH ET AL.) 15 OCTOBER 1991, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-25
Y	EP, A2, 0 239 400 (WINTER ET AL.) 30 SEPTEMBER 1987, SEE ENTIRE DOCUMENT	1-25
Y	CANCER RESEARCH, VOLUME 53, NUMBER 4, ISSUED 15 FEBRUARY 1993, KREITMAN ET AL. "PSEUDOMONAS EXOTOXIN-BASED IMMUNOTOXINS CONTAINING THE ANTIBODY LL2 OR LL2-FAB' INDUCE REGRESSION OF SUBCUTANEOUS HUMAN B-CELL LYMPHOMA IN MICE" PAGES 819-825, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-25
Y	J. CLINICAL ONCOLOGY, VOLUME 9, NUMBER 4, ISSUED APRIL 1991, GOLDENBERG ET AL. "TARGETING, DOSIMETRY, AND RADIOIMMUNOTHERAPY OF B-CELL LYMPHOMAS WITH IODINE-131-LABELED LL2 MONOCLONAL ANTIBODY" PAGES 548-564, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-25
Y	INT. J. CANCER, VOLUME 56, ISSUED 15 FEBRUARY 1994, SHIH ET AL. "INTERNALIZATION AND INTRACELLULAR PROCESSING OF AN ANTI-B-CELL LYMPHOMA MONOCLONAL ANTIBODY, LL2" PAGES 538-545, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US95/09641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

435/91; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.73, 388.8, 391.1, 391.3, 391.5; 536/23.53

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K	49/00	A 6 1 K	49/00
C 0 7 K	16/30	C 0 7 K	16/30
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	21/02
	21/08		21/08
//(C 1 2 P	21/02		Z
C 1 2 R	1:91)		C
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB , GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, M N, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU , SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN		